

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONICA VASQUES MANGAS PEREIRA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA EM CINCO RESERVATÓRIOS DO
RIO IGUAÇU ATRAVÉS DE BIOMARCADORES EM *Astyanax bifasciatus*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

CURITIBA

2015

MONICA VASQUES MANGAS PEREIRA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA EM CINCO RESERVATÓRIOS DO
RIO IGUAÇU ATRAVÉS DE BIOMARCADORES EM *Astyanax bifasciatus*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação, no Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Monica Vasques Mangas Pereira** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 24 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Orientador e Presidente

Profa Dra Cláudia Bueno dos Reis Martinez
Membro

Profa. Dra. Helena Cristina Silva de Assis
Membro



Visto:

Profª. Drª. Isabela Galarda Varassin
Coordenadora do PPG-ECO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje e, em particular, a algumas pessoas que contribuíram diretamente na construção deste trabalho:

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, pela orientação, incentivo e principalmente por ter me aceito em uma situação tão “atípica e de risco”, como ele mesmo disse. Agradeço muito pela confiança depositada em mim, pelo carinho, e por ter me dado a oportunidade de viver tudo o que vivi em Curitiba, os momentos inesquecíveis pelos quais passei, as pessoas sensacionais que conheci e tudo que aprendi nesse período de minha formação, e que levarei em minha vida para sempre.

À Flávia Yamamoto, que me ensinou como trabalhar com biologia molecular, com toda dedicação e paciência, pela enorme ajuda à distância, e também pela amizade fora do laboratório.

Aos professores da PPGECO, por tudo que aprendi durante as disciplinas, em especial ao Prof. Dr. André Padial, pela ajuda na parte estatística de meu trabalho.

Aos colegas de mestrado, Bianca, Sabrina, Chico, Emanuel, Fernanda, Gabriela, Renata, Sandra e Simone, que foram ótimas companhias durante as disciplinas, e fora delas também.

À Sabrina Calado, pela parceria, amizade, risadas dentro e fora de hora, pelas noites de estudo, e por ter tornado meus dias curitibanos muito mais divertidos.

Aos parceiros de coleta Flávia, Ana, Gus e Elis, por tornarem aqueles dias de trabalho produtivos e prazerosos, e aos funcionários da COPEL, pela grande ajuda prestada.

Aos colegas de laboratório: Halina, Dandie, Samuel, Dani, Ana, Iza, Renata, Débora, sempre dispostos a me ajudar de alguma forma, e aos professores Chico e Marco.

À Halina e Prof.^a Cláudia, pela grande ajuda nas análises histopatológicas.

Ao Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, pela parceria realizada, em especial ao Gustavo Souza.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e seus funcionários, pela prestação de serviço e atendimento.

À Fundação Araucária, pelo financiamento do projeto, e à CAPES, pela bolsa de estudos.

Ao meu irmão, Gabriel, pelo lindo mapa da área de estudo e pela grande ajuda em momentos cruciais deste trabalho.

Ao meu namorado, por estar sempre ao meu lado e me fazer tão feliz.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram, sendo os grandes responsáveis por quem sou hoje e por tudo que conquistei.

*"Hey mister tree the world change, but you remain the same;
And I wonder how you survive with the environment going down the drain;
Hey miss butterfly I see you look at me with your beautiful eyes;
You must be wondering what type of creature is man".*

Ziggy Marley

RESUMO

O rio Iguaçu é o maior do estado do Paraná e o segundo rio urbano mais poluído do Brasil. A avaliação de ecossistemas aquáticos tem utilizado com frequência peixes como bioindicadores de contaminação. No presente estudo, foi utilizada uma espécie de peixe onívora e endêmica da bacia do rio Iguaçu, *Astyanax bifasciatus*. Biomarcadores são indicadores baseados em respostas mensuráveis, como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo, sendo indicativos da exposição a xenobióticos. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade da água dos reservatórios presentes ao longo do baixo rio Iguaçu: Foz do Areia, Segredo, Salto Santiago, Salto Osório e Salto Caxias, através do uso de biomarcadores de contaminação ambiental em *A. bifasciatus*. Os espécimes foram coletados nos períodos de verão e inverno de 2013. Após serem anestesiados, foram obtidos dados biométricos dos peixes para a obtenção do Índice Hepatosomático (IHS) e do Fator de Condição (K). Para as análises bioquímicas, amostras de fígado foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido a fim de avaliar a peroxidação de lipídeos e a atividade da glutatona S-transferase e da catalase. Além disso, foram coletados músculo e cérebro, destinados para análises neurotóxicas, com base na atividade da acetilcolinesterase. Para as análises histopatológicas em fígado, as amostras foram preservadas em ALFAC e analisadas através de microscopia de luz, enquanto as brânquias foram fixadas em glutaraldeído (3%) tamponado em cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2-7,4) e analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A fim de avaliar a genotoxicidade, foi coletado sangue para o Teste de Micronúcleo Písceo e para o Ensaio Cometa. Além disso, análises químicas foram realizadas em água, sedimento e tecido (músculo) para quantificação de metais, e na bile para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Os exemplares da espécie *A. bifasciatus* provenientes dos cinco reservatórios estudados apresentaram alterações medidas através dos biomarcadores que podem ser relacionadas com a baixa qualidade da água, demonstrando que o rio Iguaçu é impactado por xenobióticos, com variações em diferentes épocas do ano. Os resultados deste estudo mostram a importância da ecotoxicologia na avaliação ambiental, e que a integração de diferentes tipos de biomarcadores permite uma visão mais precisa da real situação em que determinado ambiente aquático se encontra. Além disso, os resultados encontrados sugerem a existência de fontes adicionais de contaminação ao longo do baixo rio Iguaçu, e não atribuídas somente à região metropolitana de Curitiba. O rio Iguaçu, além de apresentar unidades de conservação ao longo de seu leito, possui diversas espécies endêmicas, sendo que a manutenção da sua integridade é de extrema importância a sua conservação e manejo.

Palavras-chave: biomonitoramento, biomarcadores, *Astyanax bifasciatus*, rio Iguaçu.

ABSTRACT

Iguaçu river is the largest one in the Paraná state and the second most polluted urban river in Brazil. The studies of aquatic toxicology has frequently used fish as bioindicators of contamination. In the current work was used the species *Astyanax bifasciatus*, an omnivorous endemic fish species from Iguaçu basin. Biomarkers are indicators based on measurable responses as molecular, biochemical and cellular changes, or even physiological variations in body fluids, tissues or organs, indicating chemical exposure. The aim of the present study was to evaluate the water quality of the reservoirs present along the lower Iguaçu river: Foz do Areia, Segredo, Salto Santiago, Salto Osório and Salto Caxias, through the use of environmental contamination biomarkers in *Astyanax bifasciatus*. The specimens were collected at the summer and winter of 2013. After anesthesia, the biometric data were measured for obtaining hepatosomatic index (HSI) and the condition factor (K). For the biochemical analyzes, a liver portion was sampled and frozen at liquid nitrogen to assess further lipid peroxidation levels and the glutathione S-transferase and catalase activity. Moreover, muscle and brain were preserved as described above for neurotoxic analysis (acetylcholinesterase activity). To histopathological analyzes in liver, samples were preserved in ALFAC and analyzed by conventional light microscopy, while gills were fixed in glutaraldehyde solution (3%) buffered by cacodilic acid (0.1M, pH 7.2-7.4) and analyzed by scanning electron microscopy JEOL. To assess the genotoxicity, blood was sampled for Piscine Micronucleus test and Comet assay. The chemical analysis were obtained from muscle, water and sediment to metals and in bile to polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations. The specimens of *A. bifasciatus* sampled at the five reservoirs showed some alterations that permit to classify the poor water quality. These results demonstrate that Iguaçu river is impacted by xenobiotics, with variations at different seasons. In addition, the results clearly demonstrated how useful the biomarkers are in the environmental studies, and the integration among them allows a more accurately view of the real situation in the studied area. Furthermore, the results suggest the existence of additional sources of contamination along the river, not only attributed to the Curitiba metropolitan region, as described by governmental reporters. Iguaçu river, besides presenting protected areas along the basin, has several endemic fish species, and the maintenance of its integrity is extremely important to conservation and risk of exposure to fish population and even to human population.

Keywords: biomonitoring, biomarkers, *Astyanax bifasciatus*, Iguaçu river.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplar de <i>Astyanax bifasciatus</i> . Fonte: (BAUMGARTNER, 2012).....	21
FIGURA 2: Bacia do Iguaçu e suas principais usinas hidrelétricas	24
FIGURA 3: Biomarcadores somáticos em <i>Astyanax bifasciatus</i> coletados nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). I- Fator de Condição (K), II- Índice Hepatosomático (IHS). Acima das barras, caracteres gregos indicam diferenças significativas entre os pontos, e asteriscos indicam diferenças sazonais nos pontos. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.	36
FIGURA 4: Análise histopatológica em fígado de <i>Astyanax bifasciatus</i> através do Índice de Lesão (BERNET <i>et al.</i> , 1999). As siglas AV, BV, CV, DV, EV referem-se às coletas de verão e as siglas AI, BI, CI, DI, EI referem-se às coletas de inverno nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). Resultados expressos em média \pm erro padrão	36
FIGURA 5: Cortes histológicos de fígado de <i>Astyanax bifasciatus</i> corados em Hematoxilina e Eosina. A - Aspecto do padrão normal do fígado (barra = 50 μ m). B - Extensas áreas de necrose (cabeça de seta) (barra = 50 μ m). C - Grandes áreas de diferenciação tecidual (cabeça de setas) (barra = 100 μ m). D - Granulomatose perivascular (cabeça de seta) (barra = 50 μ m). E - Granulomatose peritubular (cabeça de seta) (barra = 50 μ m). F - Áreas de resposta inflamatória (cabeça de seta) e pré-necrótica (seta) (barra = 50 μ m). G - Área de hemorragia (cabeça de seta) (barra = 50 μ m). H e I - Neoplasias invasiva e encapsulada respectivamente (cabeça de setas) (barras = 50 μ m e 100 μ m respectivamente).....	37
FIGURA 6: Cortes histológicos de fígado de <i>Astyanax bifasciatus</i> corados em Hematoxilina e Eosina. A - Área de foco basófilo (cabeça de setas) (barra = 50	

µm). B - Extensa área de necrose (setas) associadas à presença de parasitos (cabeça de setas) (barra = 50 µm). 38

FIGURA 7: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Foz do Areia - Verão. A - As setas mostram intensa fusão entre lamelas primárias. B - Aspectos alterados das lamelas secundárias (setas). C - Intensa deformidade das lamelas secundárias (seta preta) e presença de aneurismas (seta branca). D - A seta preta indica fusão de lamelas secundárias enquanto a branca mostra hipertrofia destas lamelas seguida de descamação. E - Neoplasia nas lamelas primárias (setas). F - Intensa ocorrência de aneurismas (setas). G - Aneurisma (seta branca) e hipertrofia do epitélio lamelar primário e secundário (seta preta). H - Foco de hipertrofia no epitélio da lamela primária..... 41

FIGURA 8: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Foz do Areia - Inverno. A - Aspecto alterado das brânquias (setas). B - As setas mostram intensa fusão das lamelas secundárias. C - A seta branca indica lesões no epitélio da lamela primária e a preta alterações no padrão das lamelas secundárias. D- A seta mostra deformidade e descamação na lamela primária. E - As setas indicam intensa hipertrofia do epitélio da lamela primária e descamação do mesmo. F - A seta branca mostra hipertrofia do epitélio da lamela secundária e a seta preta indica a presença de aneurisma e deformação do padrão no mesmo tipo de lamela..... 42

FIGURA 9: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Segredo - Verão. A - Aspecto geral das lamelas primárias e secundárias. B - A seta indica hipertrofia das células epiteliais das lamelas primárias. C - Neoplasias. D - Hiperplasia em células epiteliais da lamela primária e descamação em lamelas secundárias. E - Aneurisma. F - Descamação epitelial em lamelas secundárias 43

FIGURA 10: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Segredo - Inverno. A e B - Aspecto padrão normal de brânquias. a - A seta indica presença de parasito. C - Fusão

interlamelar. D - Alterações nas lamelas indicando hiperplasia da lamela primária e desarranjo das lamelas secundárias. E - Hiperplasia da lamela primária. F - Hiperplasia do epitélio da lamela primária e secundária com descamação do mesmo. 44

FIGURA 11: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Santiago - Verão. A - Aspecto padrão com poucas alterações. B - Alterações no arranjo epitelial da lamela primária. C - Desarranjo das lamelas secundárias. D - Hipertrofia e descamação do epitélio das lamelas primárias. E - Fusão interlamelar. F - Desarranjo do epitélio da lamela primária 45

FIGURA 12: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Santiago - Inverno. A e B. Alterações no padrão normal das lamelas secundárias. C e D - Hipertrofia e descamação do epitélio da lamela primária respectivamente. E - Fusão interlamelar. F - Intensa alteração do padrão do epitélio da lamela primária. ... 46

FIGURA 13: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Osório - Verão. A - Aspecto alterado das lamelas secundárias. a - ocorrência de parasitos. B - Alteração intensa das lamelas primárias e secundárias. C e D - Detalhe de desarranjo das lamelas secundárias e primárias respectivamente. E - Descamação nas lamelas primárias e secundárias. F - Detalhe de alterações drásticas no padrão do epitélio das lamelas primárias 47

FIGURA 14: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Osório - Inverno. A e B - Alterações no padrão normal das lamelas primárias e secundárias. C - Alterações nas lamelas primárias e secundárias. D - Fusão interlamelares. E e F - hipertrofia e descamações epiteliais na lamela primária..... 48

FIGURA 15: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Caxias - Verão. A e B - Alterações leves no padrão normal das lamelas primárias e secundárias. C e D - Aspecto alterado das lamelas primárias e secundárias respectivamente. E -

Fusão intensa de lamelas secundárias. F - Alterações no padrão do epitélio da lamela primária. G - Intensa descamação e alteração no padrão das lamelas secundárias. H - Hiperplasia pontual do epitélio das lamelas primárias..... 49

FIGURA 16: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Caxias - Inverno. A - Alterações no padrão normal das lamelas secundárias. B, C, E e G. Intensa fusão interlamelar das lamelas secundárias. D - Alteração no padrão normal das lamelas secundárias. F - Hiperplasia do epitélio das lamelas secundárias. H - Intensa alteração do padrão do epitélio das lamelas secundárias 50

FIGURA 17: Biomarcadores bioquímicos em *Astyanax bifasciatus* coletados nos reservatórios de Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). I- Lipoperoxidação, II- Atividade da Glutathione S-Transferase, III- Atividade da Catalase, IV- Atividade da AChE no músculo, e V- Atividade da AChE no cérebro. Acima das barras, caracteres gregos indicam diferenças significativas entre os pontos (verão e inverno são independentes), e asteriscos indicam diferenças sazonais nos pontos. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. 53

FIGURA 18: Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo Písceo em *Astyanax bifasciatus* coletados nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). I- Escore de dano no DNA observado pelo Ensaio Cometa, II- Frequência de Alterações Morfológicas Nucleares no Teste de Micronúcleo Písceo. Caracteres latinos (a,b) indicam diferenças significativas entre os pontos no verão, caracteres gregos (α, β, γ) indicam diferenças significativas entre os pontos no inverno, * indica diferenças sazonais nos pontos..... 54

FIGURA 19: I- Concentração média PAHs totais, e II- Concentração média de PAHs de 2 a 6 anéis por mg de proteína de bile de *Astyanax bifasciatus* coletados nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). Resultados expressos em média \pm desvio padrão 55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Alterações histopatológicas analisadas em fígado com seus respectivos fatores de importância (modificado a partir de Bernet <i>et al.</i> , 1999).....	28
TABELA 2: Dados biométricos de <i>Astyanax bifasciatus</i> coletados nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E), nos períodos de verão e inverno de 2013.	34
TABELA 3: Média dos parâmetros físico-químicos da água obtidos nos períodos de verão e inverno de 2013, nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). Dados cedidos pelas empresas Copel e Tractebel	35
TABELA 4: Frequências relativas das alterações morfológicas avaliadas em fígado de <i>Astyanax bifasciatus</i> coletados nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). A frequência foi calculada dividindo-se o número de indivíduos em que a lesão avaliada foi observada pelo número total de indivíduos do grupo.....	38
TABELA 5: Avaliação morfológica por ocorrência (%) de lesões através de microscopia eletrônica de varredura em <i>Astyanax bifasciatus</i> coletados nos reservatórios de Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E) situados no Rio Iguaçu em dois períodos do ano: verão (V) e inverno (I)	40
TABELA 6: Identificação e quantificação de metais na água (I), no sedimento (II) e biodisponíveis nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). Valores expressos em média \pm desvio padrão. ND: Não detectado	56
TABELA 7: Metais bioacumulados no tecido muscular de <i>Astyanax bifasciatus</i> coletados nos reservatórios de Foz do Areia (a), Segredo (b), Salto Santiago (c), Salto Osório (d) e Salto Caxias (e). Valores expressos em média \pm desvio	

padrão. ND: não detectado. Em negrito, valores acima do permitido pela legislação brasileira. *valores máximos toleráveis não previstos em legislação..57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 ÁREA DE ESTUDO	22
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 COLETA.....	26
4.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	26
4.3 PROCEDIMENTOS INICIAIS E COLETA DOS TECIDOS-ALVO.....	26
4.4 BIOMARCADORES SOMÁTICOS	27
4.5 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS.....	27
4.5.1 Análise Histopatológica do fígado	27
4.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
4.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	29
4.6.1 Quantificação Proteica	29
4.6.2 Análises Bioquímicas	29
4.6.2.1 Peroxidação de lipídeos (LPO).....	29
4.6.2.2 Glutathione S-Transferase (GST).....	30
4.6.2.3 Catalase (CAT).....	30
4.6.2.4 Acetilcolinesterase (AChE).....	31
4.7 BIOMARCADORES GENÉTICOS	31
4.7.1 Ensaio Cometa.....	31
4.7.2 Teste do Micronúcleo Písceo	32
4.8 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.....	32

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE METAIS.....	32
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
5 RESULTADOS	34
5.1 INDIVÍDUOS COLETADOS	34
5.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA	34
5.3 BIOMARCADORES SOMÁTICOS	35
5.4 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS.....	36
5.4.1 Histopatologia do fígado.....	36
5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
5.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	53
5.6 BIOMARCADORES GENÉTICOS	54
5.7 ANÁLISES QUÍMICAS	55
5.7.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em bile	55
5.7.2 Quantificação de Metais	55
5.7.2.1 Água e Sedimento.....	55
5.7.2.2 Metais no Músculo.....	57
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A qualidade da água é representada por um conjunto de características de natureza química, física e biológica, e é resultante de fenômenos naturais e de atividades antrópicas (SPEARLING, 2005). A qualidade da água, em conjunto com outras características e propriedades do meio ambiente que afetam os seres humanos e outros organismos, é definida como qualidade ambiental.

A qualidade ambiental de reservatórios está intrinsecamente associada às condições da qualidade da água de seus rios contribuintes, bem como às atividades econômicas implantadas e condições sanitárias do entorno, à ocupação e uso do solo, e ao tempo de residência de suas águas. Atividades industriais e agrícolas e despejo de esgotos podem contaminar a água com substâncias como hidrocarbonetos, metais, nitratos, substâncias orgânicas e materiais radioativos (TUNDISI, 2005).

Reservatórios são sistemas com dinâmica intermediária, entre lótica e lântica, e têm como função principal o armazenamento de água e a regularização de vazões (TUNDISI, 1999; STRASKRABA; TUNDISI, 2000). A avaliação da qualidade da água em reservatórios é importante para a implementação de programas de monitoramento e remediação, com a finalidade de reduzir o risco de contaminação que possíveis poluentes presentes na água possam causar (KOUKAL *et al.*, 2004).

A determinação do nível de contaminação de um ambiente aquático é usualmente feita a partir de análises físico-químicas da água (ANDREOLI, 2003). No entanto, este tipo de análise apenas quantifica substâncias isoladas em uma amostra, sendo capaz de identificar somente uma fração de substâncias tóxicas conhecidas (LIVINGSTONE, 1993). Além disso, não informam sobre possíveis interações entre poluentes e sobre seus efeitos na biota.

Por outro lado, testes ecotoxicológicos têm como ferramenta as análises biológicas, que revelam efeitos deletérios agudos ou crônicos em organismos vivos causados por um agente tóxico, e permitem avaliar a contaminação de um ambiente por diversas fontes poluidoras, contínuas ou não, como efluentes domésticos, industriais e agrícolas, medicamentos e produtos químicos em

geral (AZEVEDO; CHASIN, 2004). Possibilitam a detecção de efeitos de substâncias nocivas desconhecidas que possam surgir no ambiente aquático (LIVINGSTONE, 1993), além de avaliar os efeitos combinados das substâncias ali presentes.

Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores, ou bioindicadores, que são espécies cuja presença, abundância ou condições indicam precocemente sinais de estresses ambientais causados por contaminantes (SEIFFERT, 2008). Um bom bioindicador responde a pequenas alterações do ambiente, é representativo em relação à área de estudo, é de fácil coleta e identificação e oferece quantidade suficiente de material biológico.

Os biomarcadores são indicadores baseados em respostas mensuráveis como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas em células, fluídos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo, determinando o efeito da exposição a uma ou mais substâncias tóxicas (LAM; GRAY, 2003). Possibilitam a avaliação da saúde dos indivíduos presentes em um determinado local, e sugerem relações de causa e efeito entre a exposição aos contaminantes e os efeitos observados no organismo.

A utilização em conjunto de diferentes biomarcadores é de grande importância, pois permite avaliar as condições da biota em diferentes níveis biológicos e nos primeiros sinais de perturbação ambiental, de forma que medidas preventivas possam ser tomadas evitando um comprometimento mais severo do ambiente.

Dentre os biomarcadores somáticos, o Fator de Condição (K) relaciona o peso e o comprimento corporal, determinando o grau de bem-estar do peixe. Desta forma, nutrição, doenças e contaminantes estão altamente relacionados com este indicador. A estimativa do fator de condição pode ser feita por meio do Fator de Condição de Fulton, o qual assume que o crescimento é isométrico ($b = 3,0$), ou seja, o peso aumenta com o comprimento elevado ao cubo, e apesar de não ser o mais preciso, é muito utilizado quando dados sobre o crescimento ao longo da vida dos indivíduos não estão disponíveis.

O índice hepatossomático (IHS) representa o percentual de massa de fígado em relação ao peso corporal. Uma vez que o fígado é o principal órgão envolvido no processo de detoxificação em um organismo, o IHS pode indicar distúrbios devido a condições ambientais adversas. Reduções no IHS podem

estar associadas à utilização de reservas energéticas para a manutenção da homeostasia (RANZANI-PAIVA; TAVARES-DIAS, 2002).

Os biomarcadores histopatológicos constituem uma ferramenta sensível para diagnosticar efeitos subletais de xenobióticos. Substâncias tóxicas podem provocar mudanças bioquímicas e fisiológicas nos organismos, resultando em lesões nas células, tecidos e órgãos. Assim, as lesões encontradas podem ser utilizadas para monitorar o efeito dos poluentes.

O fígado está envolvido com aproximadamente 5000 funções vitais, e possui papel essencial no metabolismo de xenobióticos. Apesar de apresentar uma alta taxa de regeneração, o acúmulo de lesões irreversíveis, devido à exposição a xenobióticos, pode levar a um comprometimento severo nas funções deste órgão. Assim, a histopatologia do fígado representa um biomarcador eficiente para avaliar efeitos de diferentes compostos tóxicos (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002; MELA *et al.*, 2007; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2007).

A histologia das brânquias é também um importante biomarcador de poluição aquática, visto que as brânquias apresentam grande superfície e estão em contato direto e constante com poluentes presentes na água. Assim, a presença de substâncias tóxicas no meio pode lesionar e alterar a morfologia das brânquias.

Por sua vez, análises com biomarcadores bioquímicos permitem avaliar o funcionamento do sistema antioxidante em tecidos alvo, indicando o nível de estresse oxidativo em que um determinado tecido/indivíduo se encontra.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas originadas a partir da redução (adição de elétrons) de uma molécula de O_2 , havendo, na maioria dos casos, formação de radicais livres, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e os radicais hidroxila (OH^{\cdot}). Pode ocorrer também formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser um radical livre, é um tipo de ROS que, da mesma forma que os radicais livres, pode ser formado durante o metabolismo oxidativo de xenobiontes (CASTRO; FREEMAN, 2001; CIRCU; AW, 2010).

As ROS são altamente reativas e capazes de interagir com macromoléculas e causar danos em lipídios, proteínas, carboidratos e no DNA (HUSAIN, 1987). A fim de combater esses agentes químicos prejudiciais à integridade celular, as células possuem mecanismos de defesa antioxidantes,

que atrasam, previnem ou removem o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O estresse oxidativo é, portanto, o desequilíbrio entre a produção de moléculas oxidantes e a presença de antioxidantes, a favor dos primeiros. O estresse oxidativo induzido por xenobióticos pode causar lesão celular oxidativa direta, mas também está envolvido na transdução de sinalização e na regulação da expressão dos genes através de mecanismos redox (BOELSTERLI, 2003).

O sistema de defesa antioxidante inclui enzimas como a Catalase (CAT), a qual desempenha papel fundamental nos organismos que vivem em condições aeróbicas, por possuir um mecanismo eficiente para remoção do peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse. A CAT tem como função dismutar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , e está localizada em maior abundância nos peroxissomos.

A enzima Glutathione S-Transferase (GST), por sua vez, pode ser indiretamente associada ao estresse oxidativo, uma vez que utiliza como cofatora a glutathione reduzida, que também participa da degradação do peróxido de hidrogênio. A reação de conjugação do grupo sulfidrílico da glutathione com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos, catalisada pela GST, torna os produtos da reação menos tóxicos e mais hidrofílicos, facilitando a eliminação destes compostos.

A Peroxidação Lipídica (LPO) é um dos danos mais importantes causados pelas espécies reativas de oxigênio, sendo as membranas celulares os locais mais susceptíveis a essas reações de oxidação. A LPO ocorre quando há deficiência no sistema de defesa antioxidante, ocasionando a formação de hidroperóxidos, que geram danos aos ácidos graxos da membrana celular (JIANG *et al.*, 1992). Dentre as consequências da LPO, estão a diminuição da fluidez da membrana e a inibição da atividade de proteínas transportadoras, podendo alterar as funções de transporte e o papel de barreira seletiva da membrana (CASTRO; FREEMAN, 2001).

A Acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável por hidrolisar a acetilcolina, um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo, sendo essencial na manutenção e equilíbrio da transmissão dos estímulos nervosos. Com a inibição da atividade da AChE, pode ocorrer um bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos, paralisando algumas funções

vitais do organismo afetado. A inibição da AChE por poluentes vem sendo amplamente estudada (OLSON; CHRISTENSEN, 1980; BRUIJN; HERMENS, 1993; ASSIS *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2014).

Os biomarcadores genéticos são ferramentas úteis em avaliações precoces da exposição a contaminantes por organismos aquáticos. Substâncias genotóxicas alteram a estrutura química do DNA, podendo causar câncer, morte celular e alterar a frequência de genes (MITCHELMORE; CHIPMAN, 1998). O impacto de compostos tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA pode ser investigado através, entre outros, dos testes de Micronúcleo e Ensaio Cometa.

O Teste do Micronúcleo baseia-se na detecção de pequenos núcleos (micronúcleos) formados por fragmentos resultantes de danos cromossômicos induzidos por agentes mutagênicos, ou por cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal durante a mitose (HEDDLE *et al.*, 1991; AL-SABTI; METCALFE, 1995). Assim, um aumento no número de células micronucleadas é um marcador de efeitos genotóxicos.

Originalmente desenvolvido para células da medula óssea de camundongos (SCHMID, 1975), esse teste, ao ser aplicado em peixes, é conhecido como Teste do Micronúcleo Písceo (CARRASCO *et al.*, 1990). Nestes organismos, o teste perde muito em sensibilidade, uma vez que o sangue, utilizado como tecido alvo, apresenta baixa quantidade de células em divisão. Dessa forma, foram incorporadas ao teste as Alterações Morfológicas Nucleares (AMN). As AMN podem ser utilizadas como indicadores de efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água, podendo ser classificadas como *blebbed*, *notched*, *lobed* e *vacuolated*, de acordo com as características da alteração do núcleo (CARRASCO *et al.*, 1990).

A utilização da laranja de acridina nos procedimentos de coloração é outra forma de aumentar a sensibilidade do Teste do Micronúcleo Písceo. Esta coloração, quando em fluorescência, permite a distinção de eritrócitos jovens e maduros. Os eritrócitos jovens possuem grande quantidade de RNA no citoplasma, apresentando coloração alaranjada e sendo chamados de policromáticos. Já os eritrócitos maduros apresentam menor quantidade de RNA, sendo chamados de normocromáticos (POLARD *et al.*, 2011). Dessa

forma, é possível inferir a taxa de renovação celular, que pode ser alterada pela presença de xenobióticos.

O Ensaio Cometa é uma técnica simples e rápida para detecção de quebras primárias na fita de DNA em células individuais, avaliadas por meio de eletroforese em microgel (SINGH *et al.*, 1988). O princípio do teste se baseia no fato de que o DNA de uma célula sem danos migrará em conjunto, formando um círculo. Por outro lado, caso ocorra dano ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, que migrarão em velocidades diferentes, formando-se então uma figura semelhante a um cometa. O grau de genotoxicidade pode ser descrito de várias maneiras, como pela quantidade de DNA na cauda, comprimento da cauda e pela integridade do DNA (TICE, 1995).

Dentre compostos que podem gerar danos no DNA, encontram-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs). Os PAHs são hidrocarbonetos contendo dois ou mais anéis aromáticos dispostos de forma linear, angular ou agrupada, e são formados principalmente pela combustão incompleta da matéria orgânica. A degradação biológica de PAHs está inversamente relacionada com o aumento do número de anéis e com a baixa solubilidade em água (ZAIDI; IMAM, 1999).

Dezesseis PAHs são indicados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) como sendo poluentes prioritários, e têm sido cuidadosamente estudados devido à sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente. A presença de produtos da metabolização dos PAHs na bile pode ser um bom indicador de contaminação crônica, uma vez que a metabolização destes compostos é eficiente, sendo a bile a principal rota de excreção destes compostos.

Assim, devido a suas inúmeras vantagens, os biomarcadores vêm sendo comumente utilizados em programas de biomonitoramento, podendo ser aplicados em uma ampla variedade de organismos vivos (LIVINGSTONE, 1993; LAM; GRAY, 2003; BUSSOLARO *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2013).

Os peixes constituem um grupo de grande importância nas avaliações de toxicidade ambiental, pois apresentam ampla distribuição geográfica e participam de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, além de possuírem mecanismos semelhantes aos encontrados em mamíferos (MELA *et al.*, 2010),

sendo considerados excelentes modelos biológicos de estudo (RABITTO *et al.*, 2011; BRITO, 2012).

O gênero *Astyanax* compreende peixes popularmente conhecidos como lambaris, e suas mais de 100 espécies distribuem-se por quase toda a região Neotropical. Abrange indivíduos de pequeno porte, dulcícolas, não migradores e com fecundação externa (VAZZOLLER; MENEZES, 1992). Além disso, são classificados como relativamente tolerantes a degradações ambientais (MENNI *et al.*, 1996), característica necessária a uma espécie indicadora.

Astyanax bifasciatus (GARAVELLO; SAMPAIO, 2010) (Figura 1) apresenta nadadeiras anal, caudal e dorsal avermelhadas, e é conhecido como lambari-do-rabo-vermelho. Pode ser diferenciado de outras espécies de lambaris por possuir uma mancha umeral preta alongada verticalmente, sendo a porção superior mais larga que a inferior, seguida de uma mancha pós-umeral difusa. É uma das espécies mais abundantes no baixo rio Iguaçu, sendo sua distribuição geográfica aparentemente restrita a esta região. É considerada uma espécie herbívora, podendo alternativamente alimentar-se de insetos e algas (BAUMGARTNER, 2012).



Figura 1: Exemplar de *Astyanax bifasciatus*. Comprimento padrão 76,4 mm. Fonte: (BAUMGARTNER, 2012).

2 ÁREA DE ESTUDO

A bacia do Iguaçu está situada na região sudeste da América do Sul e drena uma área de aproximadamente 72.000 km², sendo que a maior parte (80,5%) encontra-se em território paranaense (MAACK, 1981). Grande parte dessa água vai para o abastecimento público, representando 28% do consumo total do estado.

O rio Iguaçu tem extensão total de 1320 km e atravessa os três planaltos paranaenses, com a sua nascente na região metropolitana de Curitiba e a foz no rio Paraná. Trata-se do maior e mais poluído rio do estado, e o segundo mais poluído do Brasil, atrás apenas do rio Tietê (IBGE, 2010). O elevado desnível da bacia proporciona grande potencial hidrelétrico, e assim o rio Iguaçu é o principal rio gerador de energia do sul do país.

Cinco usinas hidrelétricas de grande porte são encontradas ao longo do rio: Governador Bento Munhoz da Rocha Netto (também chamada de Foz do Areia), Governador Ney Aminthas de Barros (Segredo) e Governador José Richa (Salto Caxias), as quais pertencem à Companhia Paranaense de Energia (COPEL), e Salto Santiago e Salto Osório, as quais são administradas pela empresa Tractebel Energia (Figura 2).

A Usina Hidrelétrica de Foz do Areia, localizada no município de Pinhão – PR e a 240 km de Curitiba, é a maior usina da Copel e possui 1.676 MW de potência. Começou a operar em 1980 e suas unidades geradoras eram, na época, as maiores em operação no Brasil. A área inundada foi de 139 km², com profundidade máxima de 160 m e tempo de residência de 102 dias.

A segunda usina da Copel em potência instalada é a Usina de Segredo, com capacidade de 1.260 MW. Localizada no município de Manguaçu – PR, encontra-se a aproximadamente 285 km de Curitiba. Possui um reservatório pouco dendrítico, com tempo de residência da água de aproximadamente 47 dias.

Com capacidade instalada de 1.420 MW, a Usina Hidrelétrica de Salto Santiago está situada entre os municípios de Rio Bonito do Iguaçu e Saudade do Iguaçu – PR, a 420 km de Curitiba. A barragem desta usina, com 80 m de

altura e 1400 m de crista, forma um reservatório com 208 km² de área inundada.

No município de Quedas do Iguaçu – PR, a 465 km de Curitiba, está localizada a Usina Hidrelétrica de Salto Osório, com capacidade de 1.078 MW. Seu reservatório opera sob a forma de fio d'água, inunda uma área de 55 km² e o tempo de residência da água é de 16 dias.

A Usina de Salto Caxias, a 600 km de Curitiba, é a mais distante da capital e está localizada na divisa dos municípios de Capitão Leônidas Marques e Nova Prata do Iguaçu – PR. Foi inaugurada em 1999 e possui uma potência instalada de 1.240 MW. O relevo da região facilita a atividade agrícola na área.

O IAP (Instituto Ambiental do Paraná) classifica a qualidade da água dos reservatórios do estado do Paraná por meio do Índice de Qualidade de Água de Reservatórios (IQAR), sistema de avaliação e classificação desenvolvido pelo próprio órgão, e que considera basicamente parâmetros físico-químicos da água. Dessa forma, os reservatórios podem ser classificados em diferentes níveis de comprometimento, de classe I a VI, sendo Classe I (IQAR 0-1,50) – de não impactado a muito pouco degradado, e Classe VI (IQAR > 5,51) – extremamente poluído).

Assim, de acordo com o Relatório de Qualidade das Águas dos Reservatórios do Paraná (2005-2008), a qualidade da água do reservatório de Foz do Areia é a pior entre as usinas presentes no rio Iguaçu. Este reservatório foi considerado como moderadamente degradado, com IQAR = 3,3. Os outros reservatórios apresentaram índices menores, sendo Segredo considerado moderadamente degradado (IQAR = 2,6), e Salto Santiago (IQAR = 2,4), Salto Osório (IQAR = 2,3) e Salto Caxias (IQAR = 2,2) classificados como pouco degradados.

A partir do relatório, é possível observar uma diminuição gradual no IQAR em reservatórios mais afastados da região metropolitana de Curitiba. Na passagem por essa região, o rio Iguaçu recebe uma grande quantidade de substâncias poluidoras de origem doméstica, industrial e de escoamento difuso, sendo a maioria sem tratamento. Dessa forma, a carga de poluição oriunda da região metropolitana de Curitiba (RMC) influencia significativamente a qualidade da água do rio Iguaçu (MENDONÇA, 2004).

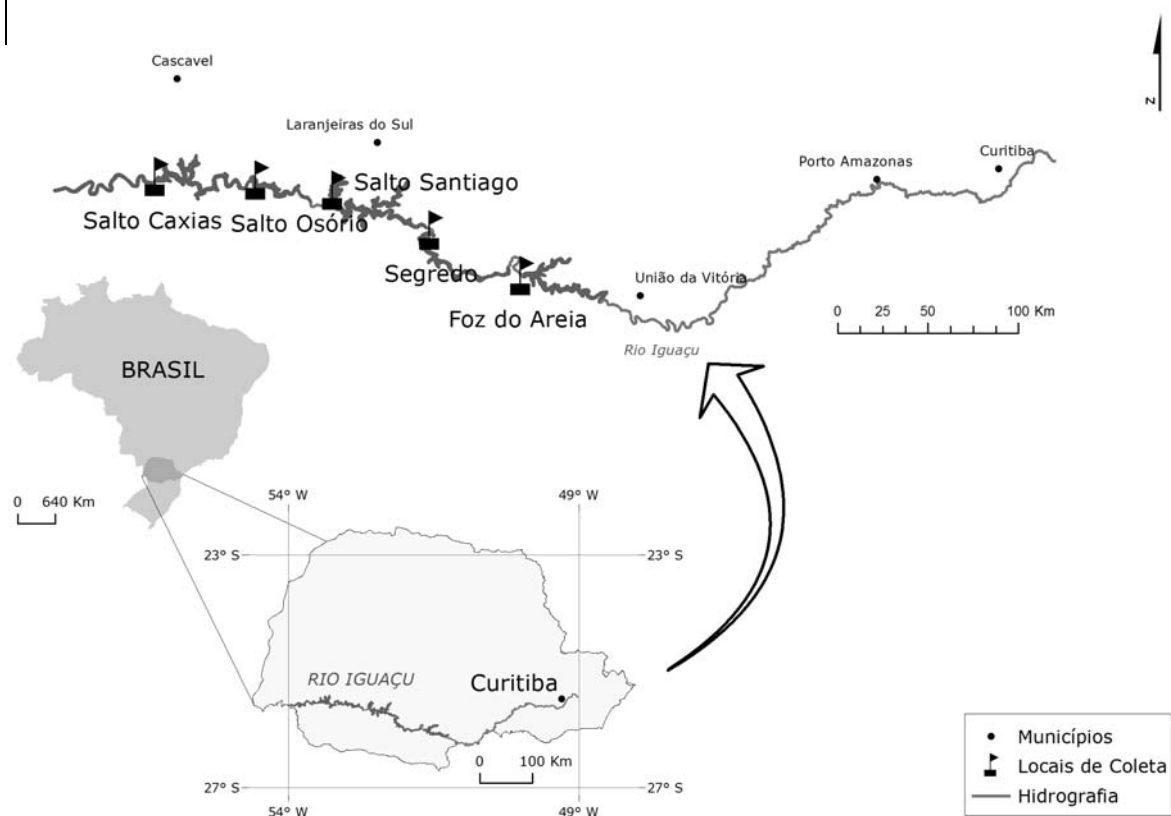


Figura 2: Bacia do Iguaçu e seus principais reservatórios.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade da água dos reservatórios Foz do Areia, Segredo, Salto Caxias, Salto Santiago e Salto Osório através de biomonitoramento com uso de biomarcadores de contaminação ambiental em *Astyanax bifasciatus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a saúde de *Astyanax bifasciatus* por meio de biomarcadores somáticos;
- Utilizar biomarcadores histopatológicos em órgãos-alvo, a fim de avaliar os efeitos agudos e crônicos dos poluentes;
- Avaliar o efeito neurotóxico e o equilíbrio óxido-redutor das células através de biomarcadores bioquímicos;
- Utilizar biomarcadores genotóxicos a fim de avaliar danos genéticos causados por contaminantes;
- Quantificar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) na bile;
- Realizar análises físico-químicas na água e relacioná-las aos fatores bióticos dos reservatórios;
- Quantificar metais presentes na água e sedimento, e metais bioacumulados no músculo dos peixes;
- Avaliar as diferenças sazonais nas respostas dos biomarcadores frente à contaminação nos reservatórios estudados;
- Gerar dados para biomonitoramentos futuros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA

Os espécimes foram coletados em dois períodos, verão e inverno, nos reservatórios Foz do Areia, Segredo, Salto Santiago, Salto Osório e Salto Caxias. O método de captura empregado foi o de rede de espera (malhas de 3 a 6 cm), que foram montadas nos reservatórios a montante das Usinas Hidrelétricas. As redes ficaram expostas por um período de 24 a 36 horas, com revistas a cada 3 ou 4 horas. Também foram realizados arrastos próximos à margem com redes de malha 0,5 cm.

4.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Os parâmetros físico-químicos da água foram concedidos pela Companhia Paranaense de Energia (COPEL) e pela empresa Tractebel Energia. Os parâmetros obtidos foram: temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido (OD).

4.3 PROCEDIMENTOS INICIAIS E COLETA DOS TECIDOS-ALVO

Imediatamente após a coleta, os peixes foram transportados aos laboratórios das usinas hidrelétricas e acondicionados em caixas isotérmicas, com constante aeração. Os indivíduos foram anestesiados com solução alcoólica de Benzocaína 2%, medidos (comprimento total, em 0,1 cm) e pesados (em 0,1 g). Em seguida, o sangue dos peixes foi coletado por meio de punção cardíaca com microcapilar heparinizado, sendo posteriormente sacrificados através de secção vertebral. O fígado foi pesado para o cálculo do índice hepatossomático.

Para as análises histopatológicas, amostras de fígado foram coletadas e fixadas quimicamente. Foram coletadas também amostras de músculo para análise de concentração de metais, e fígado, músculo e cérebro para as

análises bioquímicas, que foram armazenados em microtubos e mantidos em nitrogênio líquido até serem transportados para freezer -80° C.

4.4 BIOMARCADORES SOMÁTICOS

Para verificar a relação entre o peso do fígado com o peso corporal total de cada indivíduo foi calculado o índice hepatossomático (IHS), a partir da fórmula: **IHS = (Peso_{fígado} / Peso_{peixe}) x 100**.

O fator de condição, relação entre peso e comprimento corporal, foi calculado segundo a fórmula: **K = (Peso_{peixe} / Comprimento_{peixe}³) x 100**.

4.5 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

4.5.1 Análise histopatológica do fígado

As amostras de fígado coletadas para histopatologia foram acondicionadas em cassetes e fixados em ALFAC (álcool 85%, formol 10% e ácido acético 5%) por 16 horas. Posteriormente, foram transferidas para álcool 70%, onde permaneceram até o procedimento de inclusão. Para esta etapa, os órgãos foram desidratados em série crescente de etanol, transferidos para xilol e parafina a 58°C e, em seguida, emblocados.

Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos através de Micrótomo Leica e distendidos em lâminas com solução de albumina 20%. Para a coloração, os cortes foram desparafinizados, hidratados e corados com hematoxilina/eosina. Em seguida, após desidratação e diafanização, foram montados com lamínula em Permout.

As alterações histopatológicas observadas no fígado de todos os exemplares utilizados neste trabalho foram avaliadas de acordo com o método descrito por Bernet *et al.* (1999). Essas foram consideradas de acordo com os seus respectivos fatores de importância (Tabela 1), onde:

- (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível;
- (2) importância moderada, reversível em muitos casos e
- (3) importância marcante, geralmente irreversível, levando a diminuição das funções do órgão.

De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores para as alterações observadas em cada tratamento, sendo: (0) Inalterado, (2) Ocorrência ocasional, (4) Ocorrência moderada e (6) Ocorrência severa; lesão difusa. O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum_{alt} (\alpha w)$$

Onde: alt = alteração, α = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

TABELA 1: ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ANALISADAS EM FÍGADO COM SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA (MODIFICADO A PARTIR DE BERNET *et al.*, 1999).

Alteração histopatológica	Fator de importância
Necrose	3
Inflamação (Infiltração; Granulomatose)	2
Neoplasia	2
Alteração nuclear (Fragmentação/opacidade/megalopatia nuclear)	2
Diferenciação tecidual (Desorganização parenquimática; Foco basófilo/eosinófilo; perda de coloração)	1
Distúrbio circulatório (Congestão; Hemorragia)	1
Depósitos (Inclusões citoplasmáticas; Esteatose)	1

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As brânquias dos peixes foram fixadas em Fixador Karnovsky (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2%, Cacodilato de Sódio 0,1 M, CaCl_2 2,5mM) e desidratadas em série crescente de etanol (Merck®). Em seguida, foram submetidas ao ponto crítico (CO_2) e metalizadas. Posteriormente, as brânquias foram analisadas em microcópico eletrônico de varredura (Scanninig Electron Microscope) JEOL JSM – 6360LV.

Foram considerados: aneurismas, fusões lamelares, neoplasias, descamação lamelar, alterações estruturais das lamelas e parasitos.

4.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

4.6.1 Quantificação proteica

As concentrações de proteínas totais das alíquotas de fígado, músculo e cérebro foram determinadas para normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos (BRADFORD, 1976).

Na microplaca, foram adicionados 10 µL do sobrenadante de cada amostra, seguidos de 250 µL do reativo de Bradford® (Coomassie brilliant blue). Para o branco, foi adicionado PBS. Foram realizadas três réplicas para cada amostra e a leitura foi feita em espectrofotômetro a comprimento de onda de 595 nm.

4.6.2 Análises bioquímicas

As amostras de fígado foram descongeladas e, devido ao pequeno volume de amostra por indivíduo, foram realizados *pools* contendo uma mistura do fígado de dois a três indivíduos, gerando assim fragmentos de aproximadamente 200 mg de tecido. Estes foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6, PMSF 1 mM e, em seguida, centrifugados em uma velocidade de rotação de 12.000 g, a 4° C, durante 30 minutos. Amostras de músculo e cérebro foram homogeneizadas em tampão Fosfato de Potássio 0,1 M, pH 7,5.

O sobrenadante foi aliquotado em diferentes *eppendorfs*, com volumes conhecidos, a fim de evitar o congelamento das amostras. Antes de realizar cada análise, as amostras foram diluídas de acordo com o método a ser utilizado, a fim de alcançar a faixa de concentração de proteínas desejada.

4.6.2.1 Peroxidação de lipídios (LPO)

Os danos causados nos lipídios foram avaliados de acordo com o Método FOX (JIANG *et al.*, 1992). O princípio do método se baseia na rápida oxidação do Fe^{2+} , mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do

complexo Fe^{3+} - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a um comprimento de onda de 550-570 nm.

Em um microtubo de 2 mL foram pipetados 200 μL da amostra centrifugada concentrada, acrescida de 800 μL do meio de reação. Este foi preparado na hora, utilizando metanol 100%, laranja de xilenol 100 μM , H_2SO_4 25 mM, hidroxitolueno butilado 4 mM e $\text{FeSO}_4\cdot\text{NH}_4$ 25 μM . Após 20 minutos de reação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g.

Para a leitura, 200 μL do sobrenadante foi pipetado em microplacas e a absorbância foi medida a 550-570nm em um espectrofotômetro de microplaca.

4.6.2.2 Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi mensurada de acordo com a formação de um tioéter a partir da reação do substrato CNDB com o GSH, catalizada pela GST (KEEN *et al.*, 1976 com modificações).

Na microplaca foram adicionados 20 μL de amostra, acrescidos de 180 μL do meio de reação, com auxílio de pipeta multicanal. O meio de reação foi preparado a partir de tampão fosfato a 0,1 M pH 6,5, de solução de GSH a 3 mM (Sigma) e solução de CDNB a 3mM (Sigma Aldrich).

A absorbância foi medida em comprimento de onda de 340 nm, durante 250 segundos, em intervalos de 50 segundos. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o delta absorbância.

4.6.2.3 Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi obtida por meio da degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, monitorada pelo decréscimo de absorbância a 240 nm (AEBI, 1984).

Em uma cubeta de quartzo, foram pipetados 990 μL de meio de reação e 10 μL de amostra. O meio de reação foi preparado a partir de tampão Tris-HCl 1,0 M, água deionizada e peróxido de hidrogênio.

A absorbância foi medida imediatamente a 240 nm em espectrofotômetro de cubeta, durante 60 segundos, em intervalos de 1 segundo.

4.6.2.4 Acetilcolinesterase (AChE)

Para avaliar a atividade da AChE, foi utilizado o método de Ellman *et al.* (1961), que tem como princípio a hidrólise do substrato acetiltiocolina pela AChE, em tiocolina e acetato. A tiocolina resultante reage com o DTNB, gerando o ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato, responsável pelo aparecimento de coloração amarela, que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 405 nm.

Em uma microplaca, foram adicionados 20 µL da amostra e, com uma pipeta multicanal, 130 µL de DTNB e 50 µL de iodeto de acetilcolina. A leitura foi realizada a 405 nm, durante 4 minutos, em intervalos de 1 minuto.

4.7 BIOMARCADORES GENÉTICOS

4.7.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com Speit e Hartmann (1999), com alterações de Ferraro *et al.* (2004). Primeiramente, 10 µL do sangue homogeneizado em 1 mL soro bovino fetal foram diluídos em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão e disposto sobre uma lâmina coberta com agarose ultrapura. As lâminas foram colocadas em uma solução de lise composta de NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%) por 72 h a 4°C.

Posteriormente, as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (10 N) e EDTA (200 mM), pH > 13 por 25 minutos, para desnaturar o DNA. Foi realizada, então, a eletroforese a 300 mA e 25 V por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas em 0,4 M Tris, pH 7,5 e fixadas em etanol por 10 minutos. Os cometas foram corados com 0,02 g/ml de brometo de etídeo e contabilizados usando um microscópio de epifluorescência Leica DMLS2. Foram analisados visualmente 100 cometas por lâmina e contabilizados em cinco classes de danos segundo Collins (2004).

4.7.2 Teste de Micronúcleo Písceo

A fim de verificar a frequência de micronúcleos, foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973) e Schimd (1975) para a montagem das lâminas. Uma gota de sangue foi colocada sobre uma lâmina de microscopia e imediatamente foi realizado o esfregaço, sendo posteriormente fixado em etanol por 30 minutos e corado com laranja de acridina (UEDA *et al.*, 1992). Foram analisados 2000 eritrócitos por peixe num aumento de 1000x em um microscópio de epifluorescência.

Além dos micronúcleos, foram também contabilizadas as alterações morfológicas nucleares de acordo com Carrasco *et al.* (1990) e a frequência de eritrócitos policromáticos, segundo Ueda *et al.* (1992) e Çavas *et al.* (2005).

4.8 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

A bile foi extraída por meio de punção da vesícula biliar e armazenada em recipientes de vidro âmbar a -20°C até o momento da análise. Após a determinação da curva-padrão da bile e do padrão de PAHs para estabelecer a diluição das amostras, alíquotas de 500 µL de cada amostra foram diluídas na proporção 1:200 em etanol 48% e lidas no espectrofluorímetro nos comprimentos de onda 288/330 nm, 267/309 nm, 334/376 nm, 364/406 nm e 380/422 nm (excitação/emissão) que correspondem respectivamente aos hidrocarbonetos de dois, três, quatro, cinco e seis anéis. Os dados foram expressos em unidade de PAHs por miligrama de proteína.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE METAIS

Amostras de água foram coletadas a uma profundidade de aproximadamente 0,5 m nos cinco reservatórios estudados, sendo acidificadas no momento da coleta, mediante adição de ácido nítrico. A digestão das amostras de água foi feita por meio de aquecimento com ácido nítrico, de acordo com método 3005A da *Environmental Protection Agency*.

As amostras de sedimento e de tecido (músculo) foram digeridas com repetidas adições de ácido nítrico (HNO_3) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), de acordo com método 3005B da *Environmental Protection Agency*.

A leitura das concentrações dos metais foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica (Varian®, AA 240FS).

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados por meio de ANOVA multifatorial, seguida pelo teste de Tukey. Todos os dados foram testados para normalidade e homocedasticidade antes de realizar a análise de variância, e logaritimizados quando necessário. O nível de significância considerado foi de 0,05, e o software utilizado nas análises estatísticas foi *Statistica StatSoft 7.0*. Dados de quantificação de metais foram reportados descritivamente.

5 RESULTADOS

5.1 INDIVÍDUOS COLETADOS

Foram coletados um total de 189 espécimes nas amostragens realizadas no verão (Janeiro e Fevereiro/2013) e no inverno (Agosto e Julho/2013), sendo 20 animais em cada reservatório, exceto no reservatório Foz do Areia no verão, em que foram capturados apenas 9 indivíduos (Tabela 2).

TABELA 2: DADOS BIOMÉTRICOS DE *Astyanax bifasciatus* COLETADOS NOS RESERVATÓRIOS FOZ DO AREIA (A), SEGREDO (B), SALTO SANTIAGO (C), SALTO OSÓRIO (D) E SALTO CAXIAS (E), NOS PERÍODOS DE VERÃO E INVERNO DE 2013.

Reservatório	Período	n	Massa total (g)	Comprimento (cm)
A	Verão	20	14,31 (\pm 1,85)	10,1 (\pm 1,01)
	Inverno	20	22,78 (\pm 3,53)	12,1 (\pm 0,64)
B	Verão	20	31,4 (\pm 7,07)	13,45 (\pm 1,05)
	Inverno	20	26,48 (\pm 2,93)	13,05 (\pm 0,67)
C	Verão	20	14,45 (\pm 5,58)	10,7 (\pm 0,90)
	Inverno	20	13,67 (\pm 2,12)	10,5 (\pm 0,41)
D	Verão	9	5,32 (\pm 1,36)	7,6 (\pm 0,52)
	Inverno	20	25,04 (\pm 4,48)	12,55 (\pm 0,67)
E	Verão	20	34,38 (\pm 5,73)	13,9 (\pm 0,94)
	Inverno	20	33,81 (\pm 5,92)	13,6 (\pm 0,76)

5.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

A sazonalidade foi observada por meio do parâmetro temperatura da água, sendo a média do verão de 24,9° C e a do inverno de 16,3° C. A temperatura mais baixa foi observada no reservatório Foz do Areia, no inverno, e a mais alta no reservatório Salto Caxias, no verão (Tabela 3).

Em relação ao pH, os menores valores foram observados no reservatório de Segredo, e maiores em Salto Osório, sendo que no verão o pH foi mais alto em todos os reservatórios.

O oxigênio dissolvido (OD) apresentou menores valores nos reservatórios Salto Santiago e Salto Osório no período de verão, e no período de inverno as concentrações de OD foram maiores em todos os reservatórios.

TABELA 3: MÉDIA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA OBTIDOS NOS PERÍODOS DE VERÃO E INVERNO DE 2013, NOS RESERVATÓRIOS FOZ DO AREIA (A), SEGREDO (B), SALTO SANTIAGO (C), SALTO OSÓRIO (D) E SALTO CAXIAS (E). DADOS CEDIDOS PELAS EMPRESAS COPEL E TRACTEBEL.

Reservatório	Período	Temperatura da água (°C)	pH	Oxigênio dissolvido (mg/L)
A	Verão	26,25	7,71	7,36
	Inverno	7,13	6,73	7,63
B	Verão	23,70	5,90	7,17
	Inverno	19,23	4,93	7,47
C	Verão	22,22	7,47	4,59
	Inverno	17,35	7,13	9,21
D	Verão	24,57	7,30	5,61
	Inverno	18,06	6,86	9,57
E	Verão	27,50	6,53	7,60
	Inverno	19,86	6,63	9,13

5.3 BIOMARCADORES SOMÁTICOS

Em relação ao Fator de Condição (K) dos exemplares coletados no verão, foram observadas diferenças entre os reservatórios. O reservatório Salto Santiago apresentou índice menor que os encontrados para os exemplares dos reservatórios Segredo e Salto Caxias. No inverno, o fator de condição dos indivíduos do reservatório Salto Santiago também foi menor que os observados para os reservatórios Foz do Areia e de Salto Caxias. (Figura 3.I).

O índice hepatossomático (IHS) foi similar entre os pontos amostrados, sendo que a única diferença significativa encontrada foi entre as estações do reservatório Foz do Areia, em que esse índice se apresentou maior no inverno (Figura 3.II).

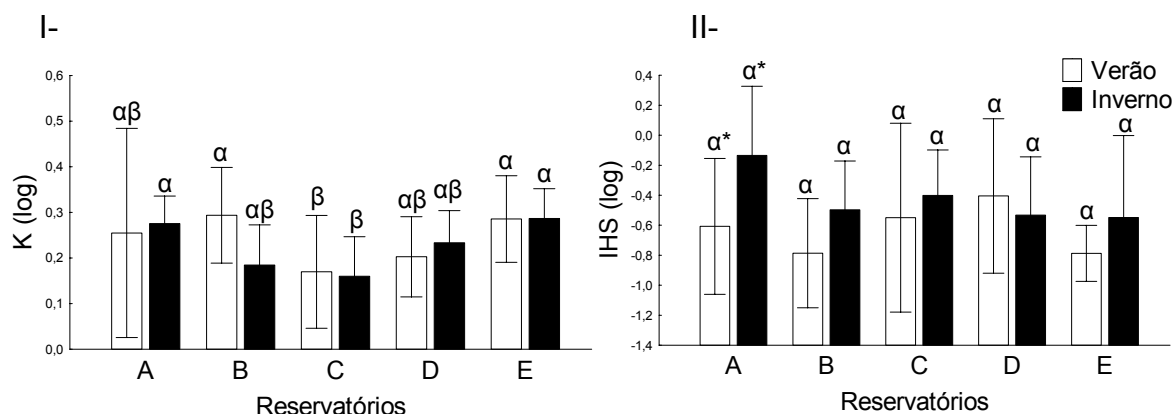


Figura 3: Biomarcadores somáticos avaliados em *Astyanax bifasciatus* coletados nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). I- Fator de Condição (K), II- Índice Hepatosomático (IHS). Acima das barras, caracteres gregos indicam diferenças significativas entre os pontos, e asteriscos indicam diferenças sazonais nos pontos. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

5.4 BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS

6.4.1 Histopatologia do Fígado

Em relação ao índice de lesão do fígado, não foram observadas diferenças significativas entre os reservatórios (Figura 4). As médias do índice de lesão variaram de 8,22 em Salto Osório a 13,2 em Foz do Areia, ambos no verão.

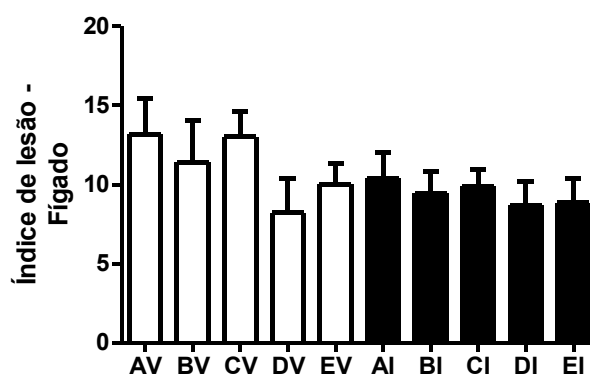
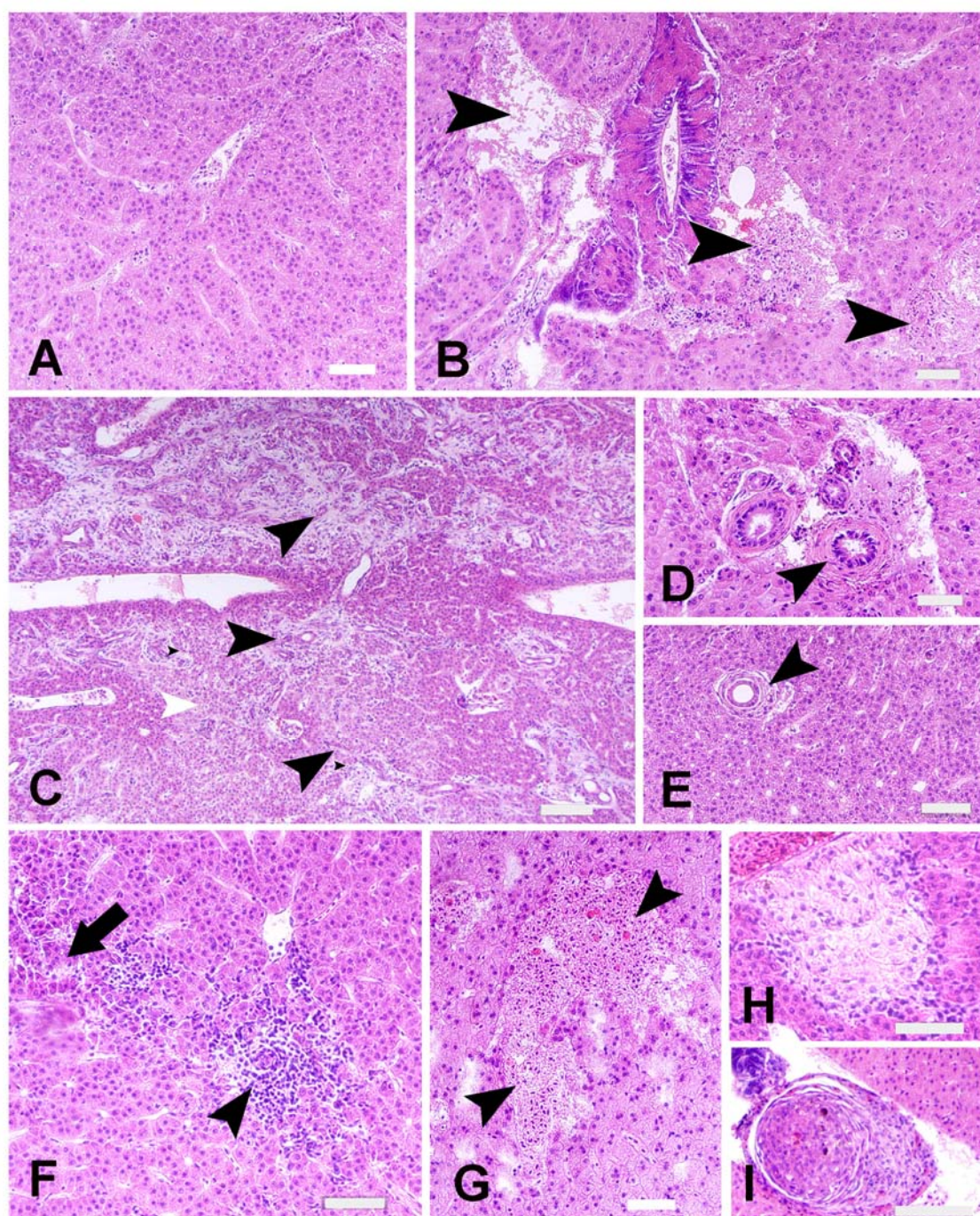


Figura 4: Análise histopatológica em fígado de *Astyanax bifasciatus* através do Índice de Lesão (BERNET *et al.*, 1999). As siglas AV, BV, CV, DV, EV referem-se às coletas de verão e as siglas AI, BI, CI, DI, EI referem-se às coletas de inverno nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). Resultados expressos em média \pm erro padrão.

Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre os pontos de coleta, poucas amostras de fígado demonstraram-se saudáveis e sem

alterações (Figura 5.A). Através da análise histopatológica foi possível observar a ocorrência de diferentes lesões no fígado, sendo a necrose (Figuras 5.B e 6.B) a lesão mais frequente (de 53,33 a 100% dos indivíduos, Tabela 4). A presença de parasitos (Figura 6.B) foi também uma alteração muito frequente, sendo observada em 50 a 100% dos indivíduos nos cinco locais de coleta. Outras alterações encontradas foram resposta inflamatória, granulomatose perivascular e peritubular (Figuras 5.D, 5.E e 5.F), diferenciação tecidual (Figuras 5.C e 6.A) e, em menor frequência, distúrbios circulatórios (Figura 5.G), neoplasias (Figuras 5.H e 5.I), áreas pré-neoplásicas como focos basófilos (Figura 6.A), depósitos citoplasmáticos e alterações nucleares.



5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises estruturais do tecido branquial demonstraram que em todos os reservatórios estudados foram apresentas algum tipo de alteração ou dano morfológico nas brânquias de *Astyanax bifasciatus* (Tabela 5).

Os exemplares coletados no reservatório de Foz do Areia no período de verão apresentaram intensas deformidades nas lamelas secundárias e fusão de lamelas primárias, além de aneurismas, neoplasia e hipertrofia no epitélio (Figura 7). No inverno, foi observada intensa alteração estrutural nas lamelas primárias e secundárias, fusão lamelar, neoplasias e descamação (Figura 8). Este grupo apresentou os maiores níveis de lesão se comparado com os outros grupos dos reservatórios estudados.

TABELA 5: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA POR OCORRÊNCIA (%) DE LESÕES ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM *Astyanax bifasciatus* COLETADOS NOS RESERVATÓRIOS DE FOZ DO AREIA (A), SEGREDO (B), SALTO SANTIAGO (C), SALTO OSÓRIO (D) E SALTO CAXIAS (E) SITUADOS NO RIO IGUAÇU EM DOIS PERÍODOS DO ANO: VERÃO (V) E INVERNO (I).

Reservatório	Período	Amostragem	Classificação	Ocorrência de Parasitos	Aneurisma	Fusão Lamelar	Neoplasia	Descamação Lamela 1ª	Descamação Lamela 2ª	Alteração Estrutural da Lamela 1ª	Alteração Estrutural da Lamela 2ª	Aspecto Geral das Brânquias
A	V	8	Brando	0	0	12,5	12,5	12,5	25	37,5	12,5	12,5
			Severo	0	12,5	12,5	0	75	50	62,5	62,5	75
	I	5	Brando	0	0	20	20	40	20	60	25	20
B			Severo	0	0	40	20	60	60	100	100	80
	V	10	Brando	0	21,5	10	10	20	40	30	10	20
			Severo	0	0	0	0	0	0	10	0	20
C	I	7	Brando	14,2	0	14,2	0	71,4	71,4	85,7	28,5	85,7
			Severo	0	0	0	0	14,2	0	0	0	0
	V	8	Brando	0	0	0	12,5	75	25	62,5	12,5	50
D			Severo	0	0	0	0	12,5	0	12,5	25	37,5
	I	9	Brando	11,1	0	0	11,1	55,5	44,4	55,5	0	55,5
			Severo	0	0	0	0	22,2	33,3	22,2	0	33,3
E	V	9	Brando	22,2	0	22,2	0	33,3	11,1	22,2	44,4	11,1
			Severo	0	0	0	0	33,3	22,2	55,5	22,2	88,8
	I	6	Brando	0	0	16,6	0	50	66,6	83,3	16,6	50
			Severo	0	0	0	0	33,3	0	16,6	0	33,3
	V	3	Brando	33,3	0	0	0	100	0	33,3	33,3	33,3
			Severo	0	0	0	0	0	0	33,3	0	0
	I	9	Brando	0	0	11,1	0	66,6	22,2	22,2	22,2	33,3
			Severo	0	0	22,2	0	11,1	44,4	44,4	33,3	55,5

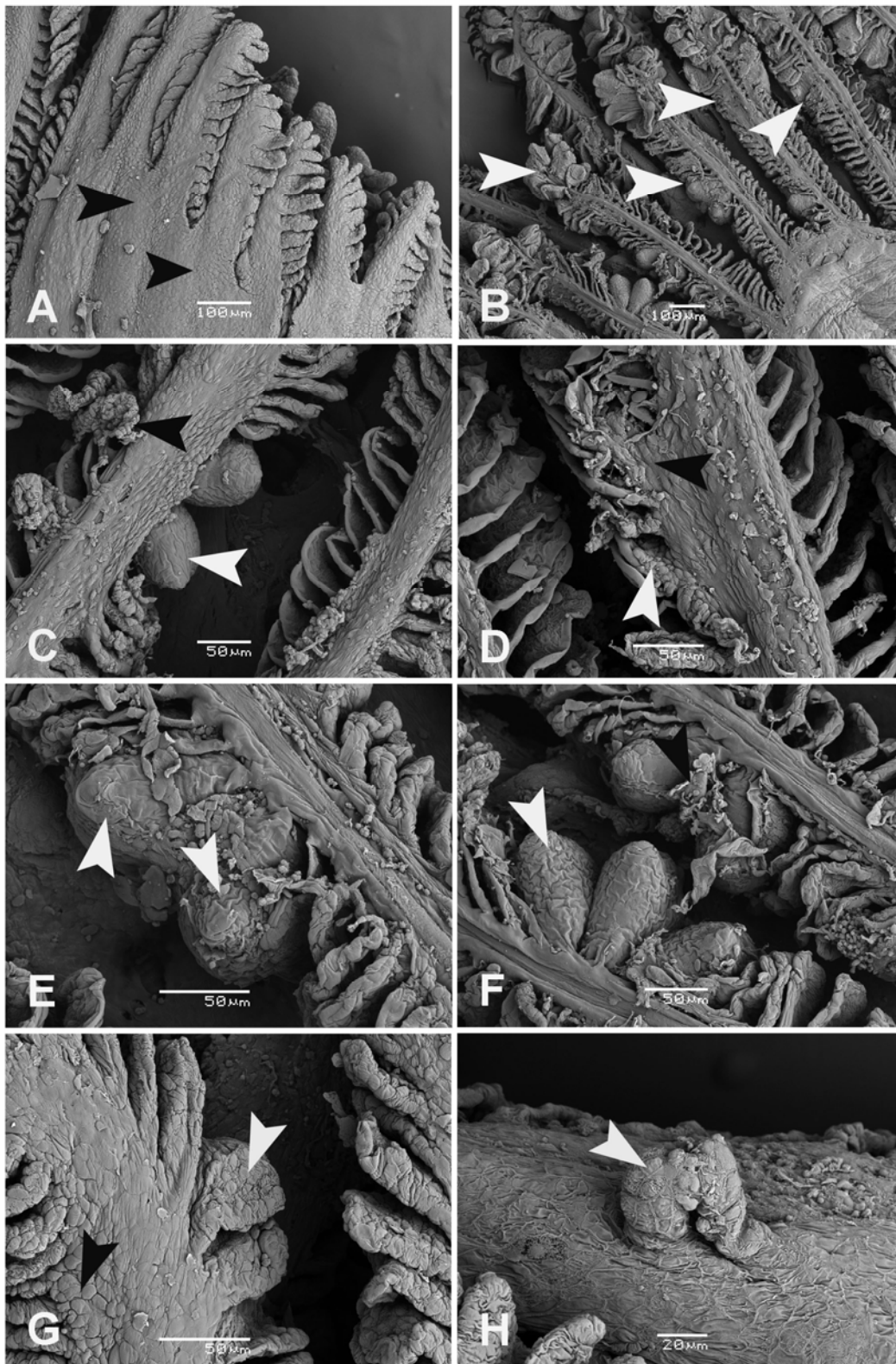


Figura 7: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Foz do Areia - Verão. A - As setas mostram intensa fusão entre lamelas primárias. B - Aspectos alterados das lamelas secundárias (setas). C - Intensa deformidade das lamelas secundárias (seta preta) e presença de aneurismas (seta branca). D - A seta preta indica fusão de lamelas secundárias enquanto a branca mostra hipertrofia destas lamelas seguida de descamação. E - Neoplasia nas lamelas primárias (setas). F - Intensa ocorrência de aneurismas (setas). G - Aneurisma (seta branca) e hipertrofia do epitélio lamelar primário e secundário (seta preta). H - Foco de hipertrofia no epitélio da lamela primária.

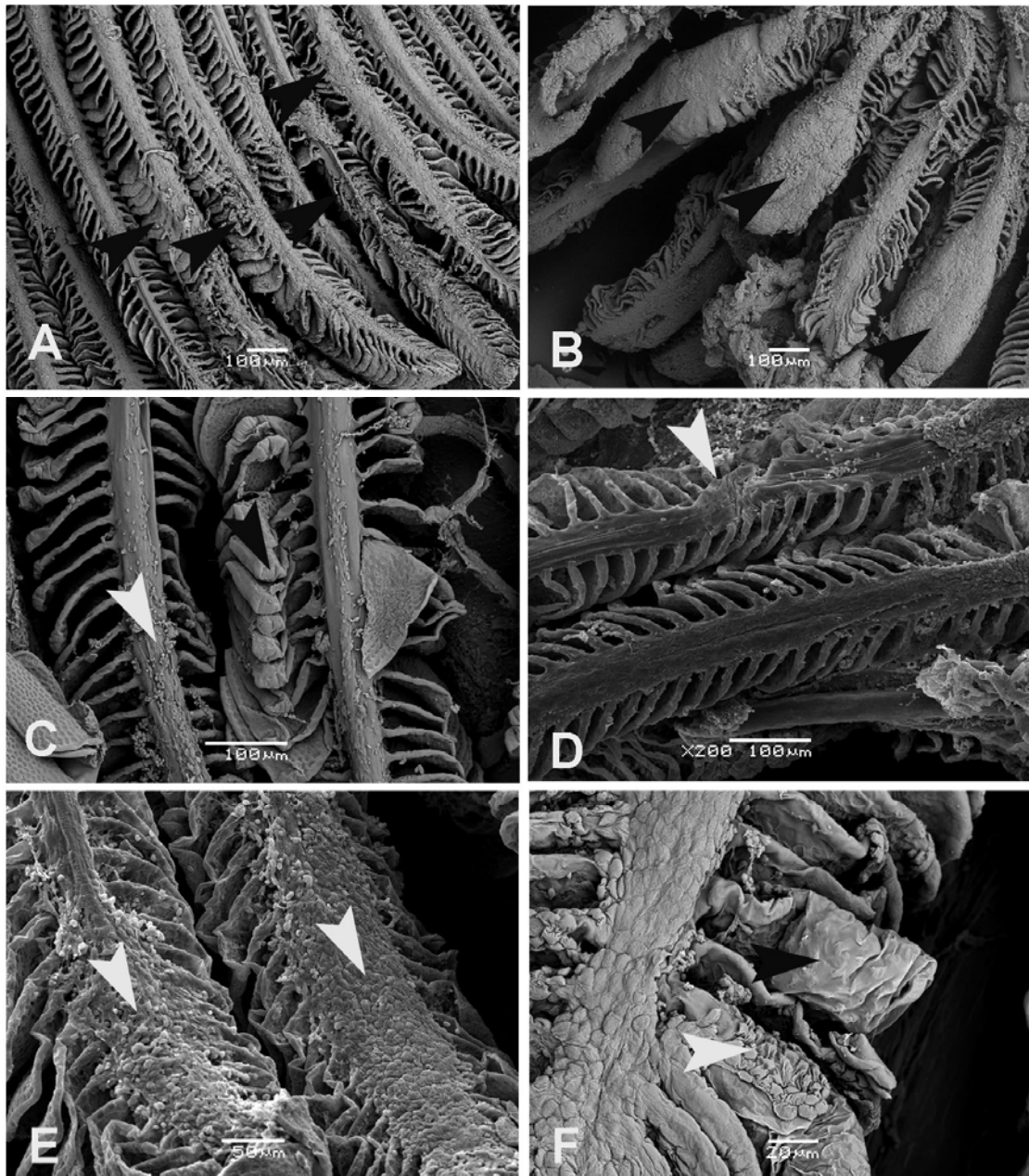


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Foz do Areia - Inverno. A - Aspecto alterado das brânquias (setas). B - As setas mostram intensa fusão das lamelas secundárias. C - A seta branca indica lesões no epitélio da lamela primária e a preta alterações no padrão das lamelas secundárias. D- A seta mostra deformidade e descamação na lamela primária. E - As setas indicam intensa hipertrofia do epitélio da lamela primária e descamação do mesmo. F - A seta branca mostra hipertrofia do epitélio da lamela secundária e a seta preta indica a presença de hipertrofia do epitélio e deformação do padrão no mesmo tipo de lamela.

Nos indivíduos coletados no reservatório de Segredo no período de verão foi possível observar hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais das lamelas primárias, descamação das lamelas secundárias, neoplasias e aneurismas (Figura 9). Na coleta de inverno, foram observados parasitos, fusão interlamelar e hiperplasia das lamelas primárias e secundárias (Figura 10).

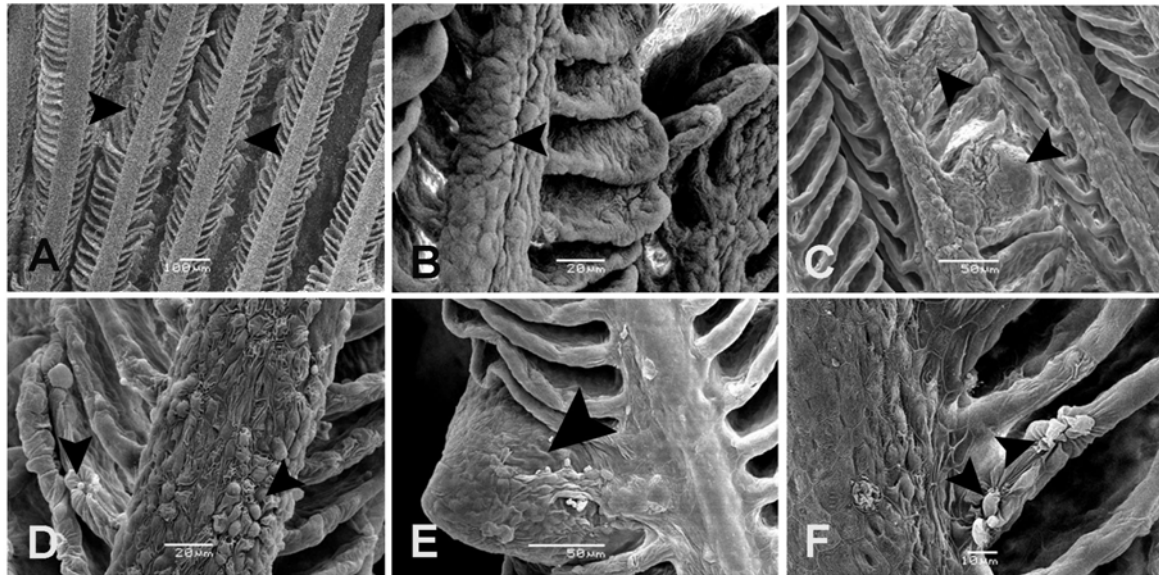


Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Segredo - Verão. A - Aspecto geral das lamelas primárias e secundárias. B - A seta indica hipertrofia das células epiteliais das lamelas primárias. C - Neoplasias. D - Hiperplasia em células epiteliais da lamela primária e descamação em lamelas secundárias. E - Aneurisma. F - Descamação epitelial em lamelas secundárias.

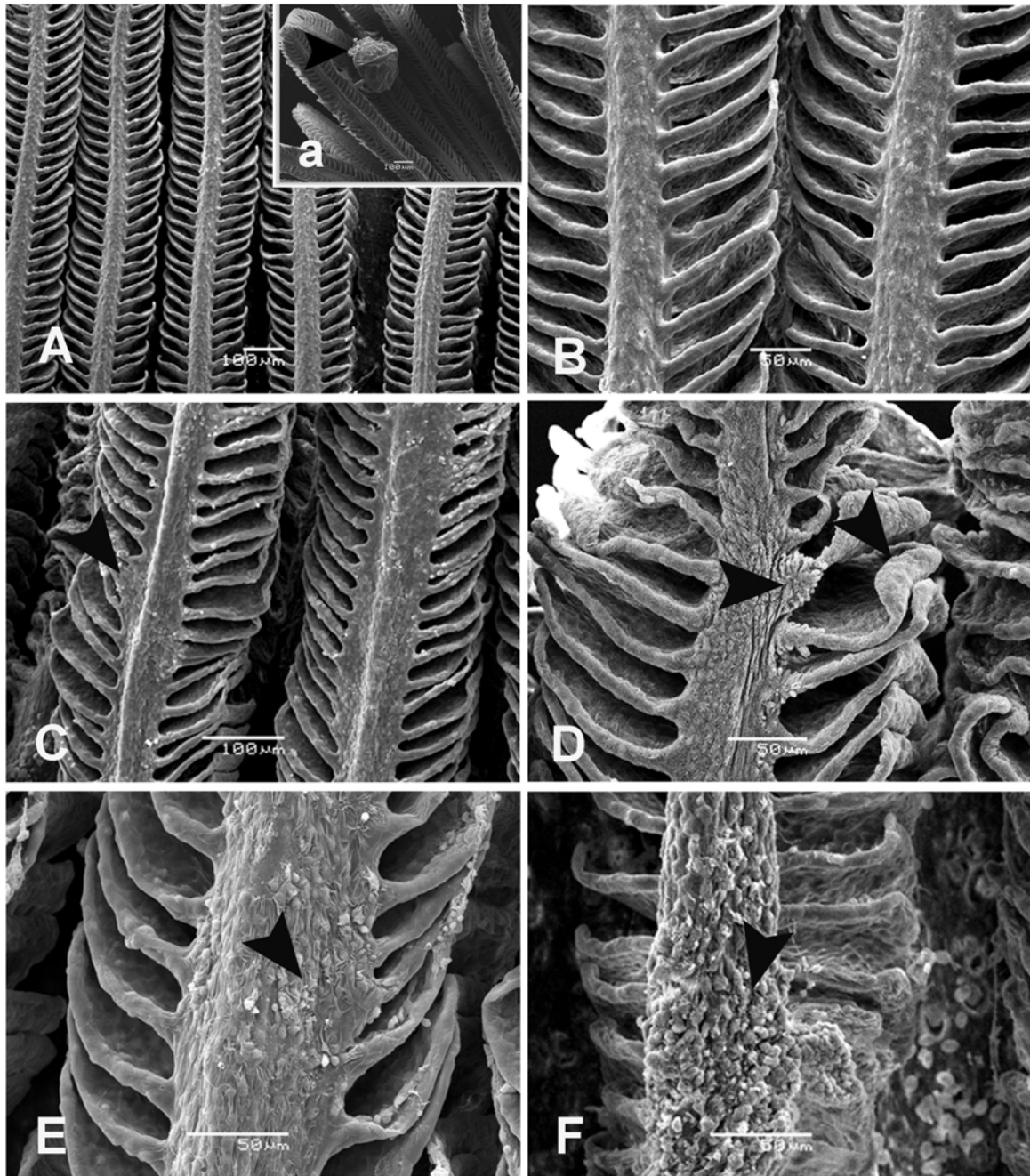


Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Segredo - Inverno. A e B - Aspecto padrão normal de brânquias. a - A seta indica presença de parasito. C - Fusão interlamelar. D - Alterações nas lamelas indicando hiperplasia da lamela primária e desarranjo das lamelas secundárias. E - Hiperplasia da lamela primária. F - Hiperplasia do epitélio da lamela primária e secundária com descamação do mesmo.

No reservatório de Salto Santiago, tanto no verão como no inverno, o tecido branquial apresentou desarranjo das lamelas primárias e secundárias, fusão interlamelar, e hipertrofia e descamação do epitélio das lamelas primárias (Figura 11 e 12).

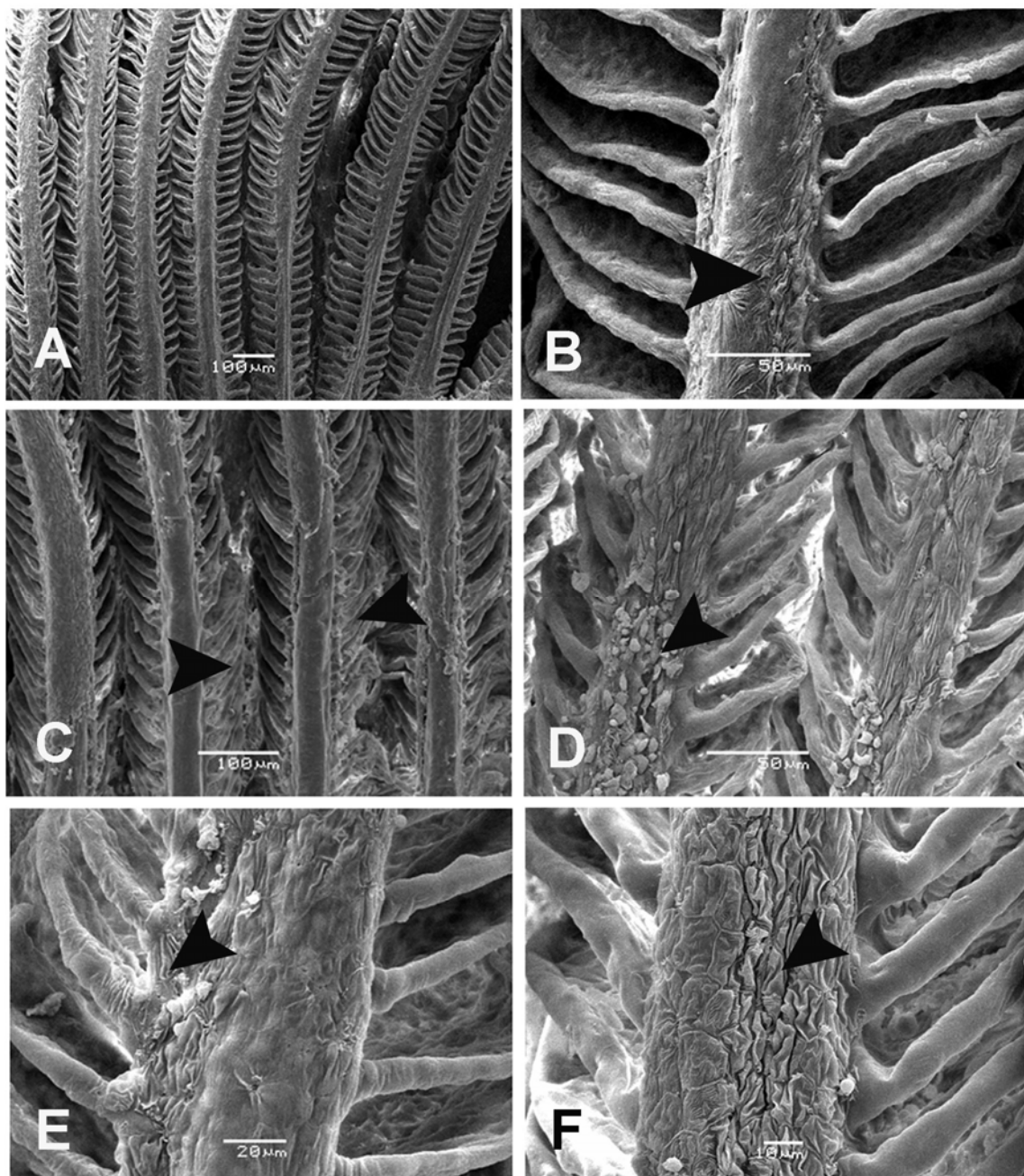


Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Santiago - Verão. A - Aspecto padrão com poucas alterações. B - Alterações no arranjo epitelial da lamela primária. C - Desarranjo das lamelas secundárias. D - Hipertrofia e descamação do epitélio das lamelas primárias. E - Fusão interlamelar. F - Desarranjo do epitélio da lamela primária.

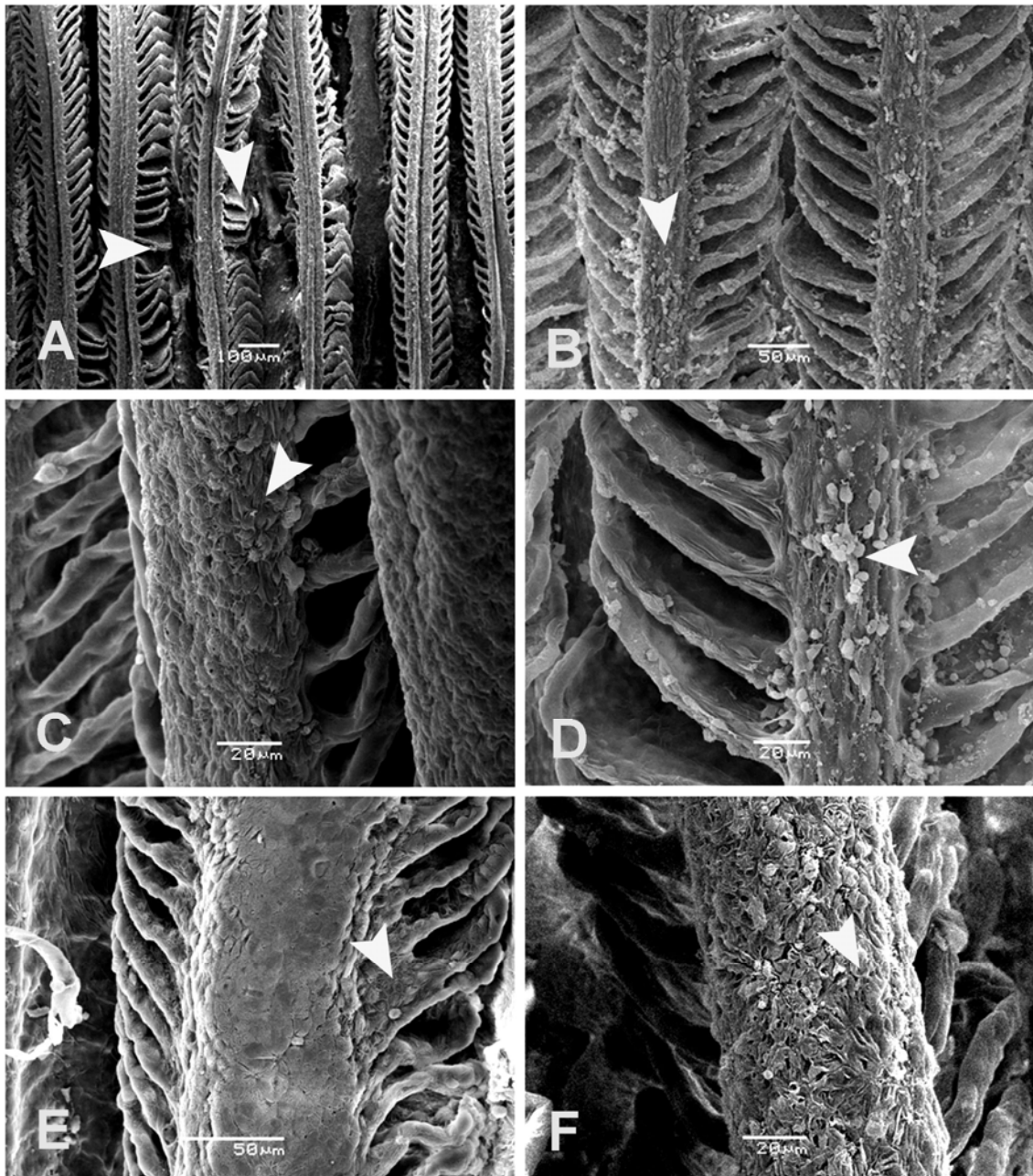


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Santiago - Inverno. A e B. Alterações no padrão normal das lamelas secundárias. C e D - Hipertrofia e descamação do epitélio da lamela primária respectivamente. E - Fusão interlamelar. F - Intensa alteração do padrão do epitélio da lamela primária.

Em relação à coleta de verão do reservatório Salto Osório, pode-se notar a ocorrência de parasito e alterações drásticas das lamelas primárias e secundárias (Figura 13). Na coleta de inverno também foram observadas alterações nas lamelas primárias e secundárias, além de fusões interlamelares e hipertrofia e descamações epiteliais na lamela primária (Figura 14).

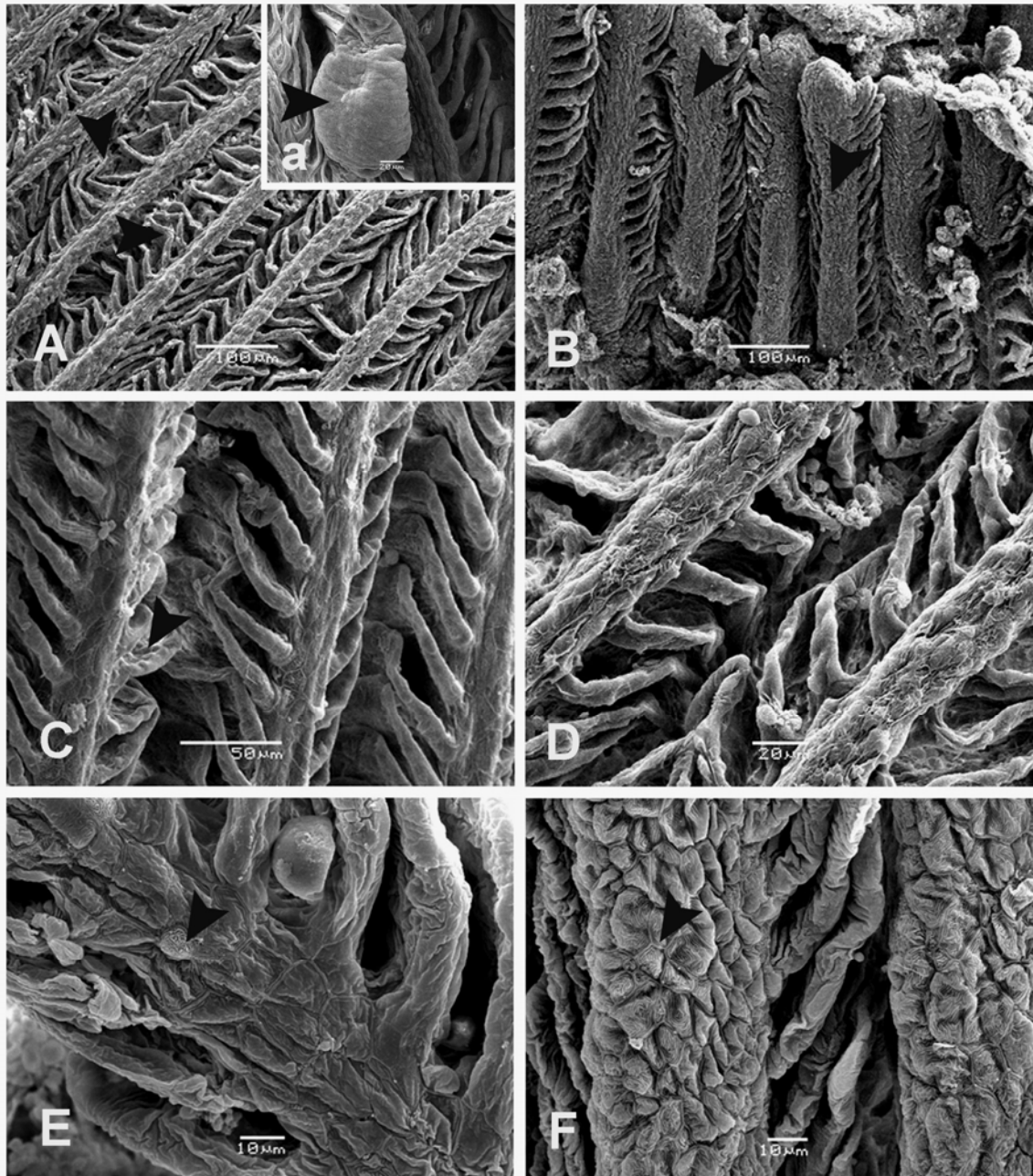


Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Osório - Verão. A - Aspecto alterado das lamelas secundárias. a - ocorrência de parasitos. B - Alteração intensa das lamelas primárias e secundárias. C e D - Detalhe de desarranjo das lamelas secundárias e primárias respectivamente. E - Descamação nas lamelas primárias e secundárias. F - Detalhe de alterações drásticas no padrão do epitélio das lamelas primárias.

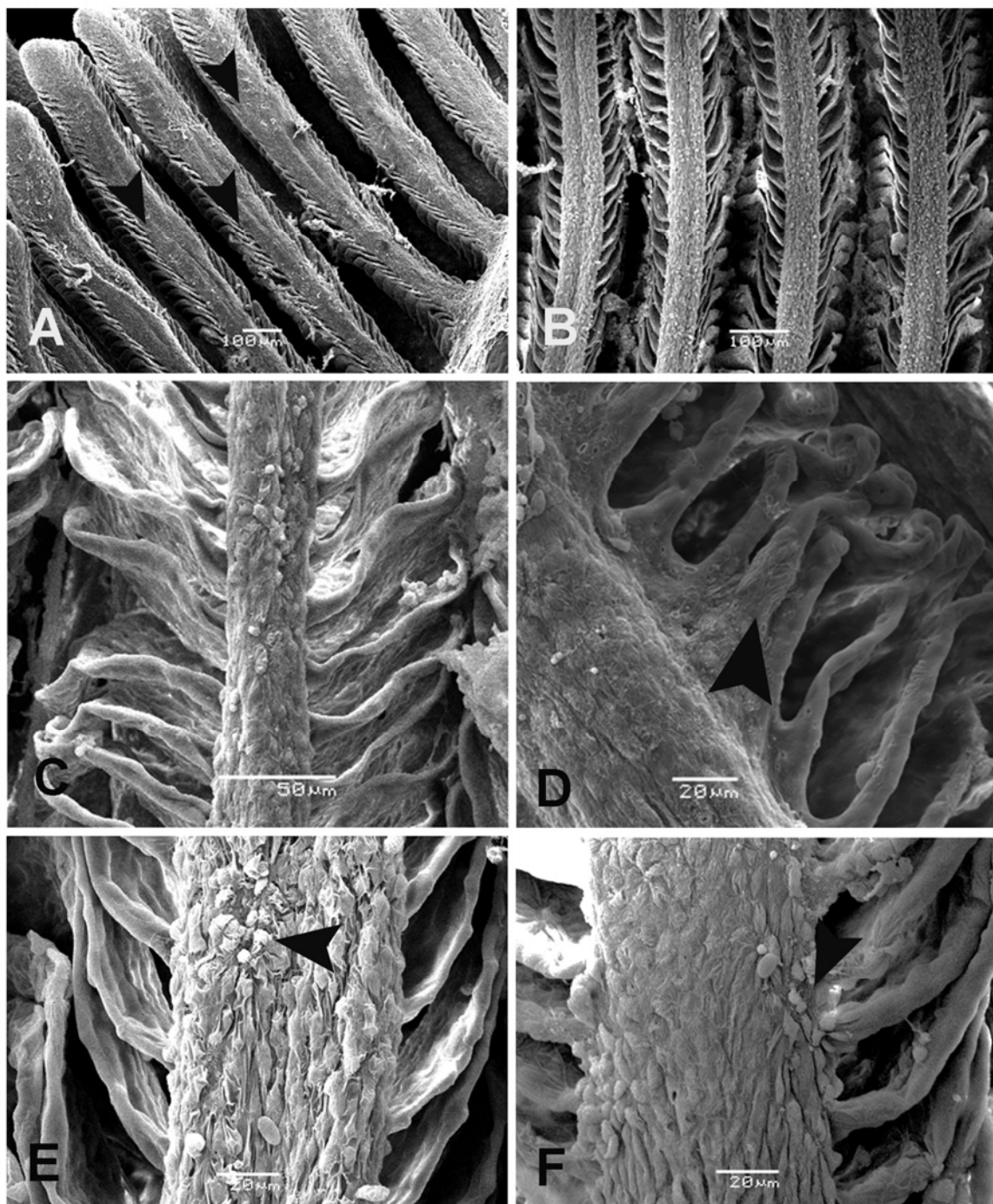


Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Osório - Inverno. A e B - Alterações no padrão normal das lamelas primárias e secundárias. C - Alterações nas lamelas primárias e secundárias. D - Fusão interlamelares. E e F - hipertrofia e descamações epiteliais na lamela primária.

O tecido branquial dos animais coletados no verão no reservatório Salto Santiago apresentou intensa fusão e descamação nas lamelas secundárias, hiperplasia e alterações no padrão do epitélio da lamela primária (Figura 15). Em relação à coleta de inverno, foram observadas intensas alterações como

fusões interlamelares e hiperplasias do epitélio das lamelas secundárias (Figura 16).

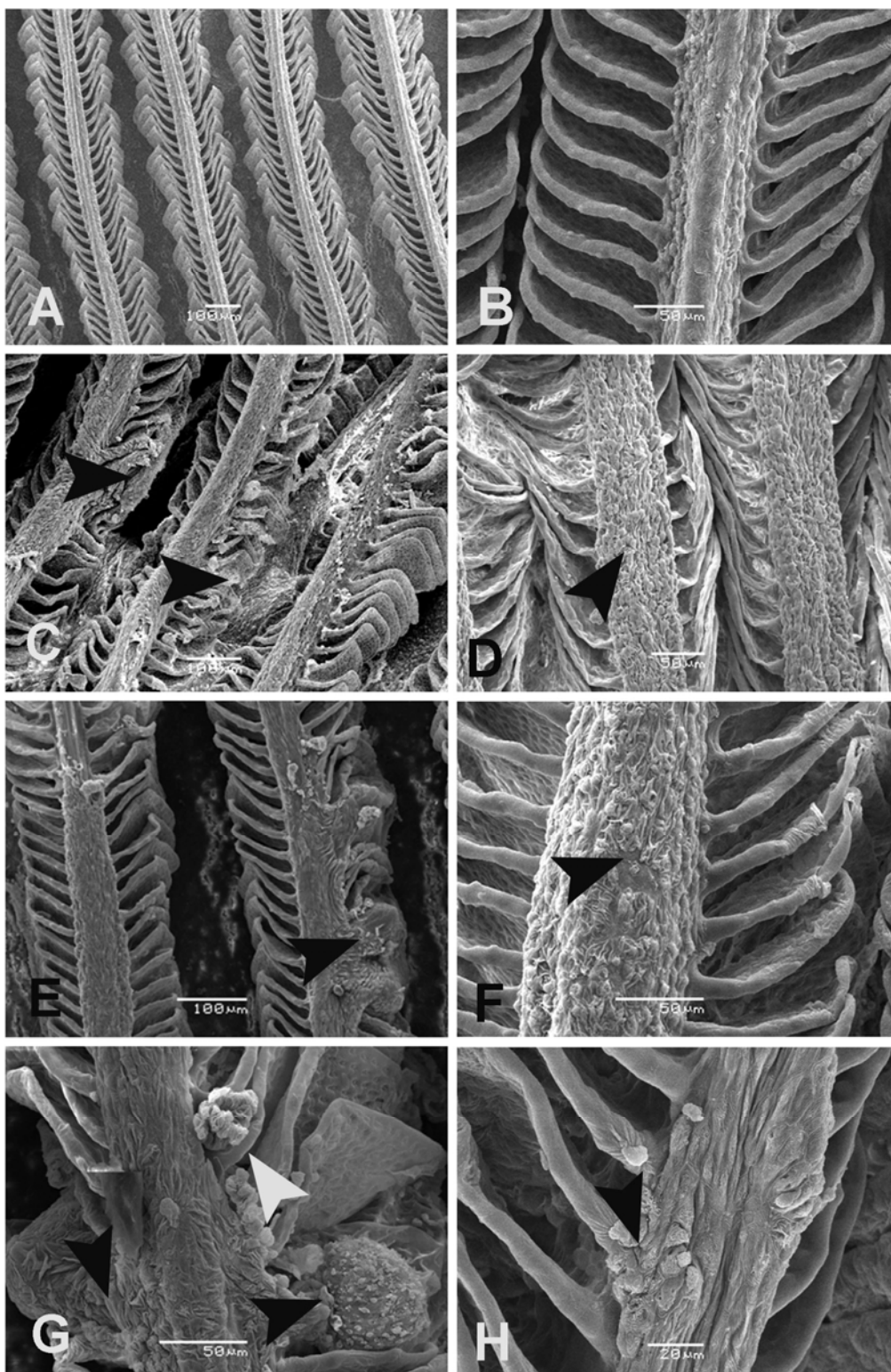


Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Caxias - Verão. A e B - Alterações leves no padrão normal das lamelas primárias e secundárias. C e D - Aspecto alterado das lamelas primárias e secundárias respectivamente. E - Fusão intensa de lamelas secundárias. F - Alterações no padrão do epitélio da lamela primária. G - Intensa descamação e alteração no padrão das lamelas secundárias. H - Hiperplasia pontual do epitélio das lamelas primárias.

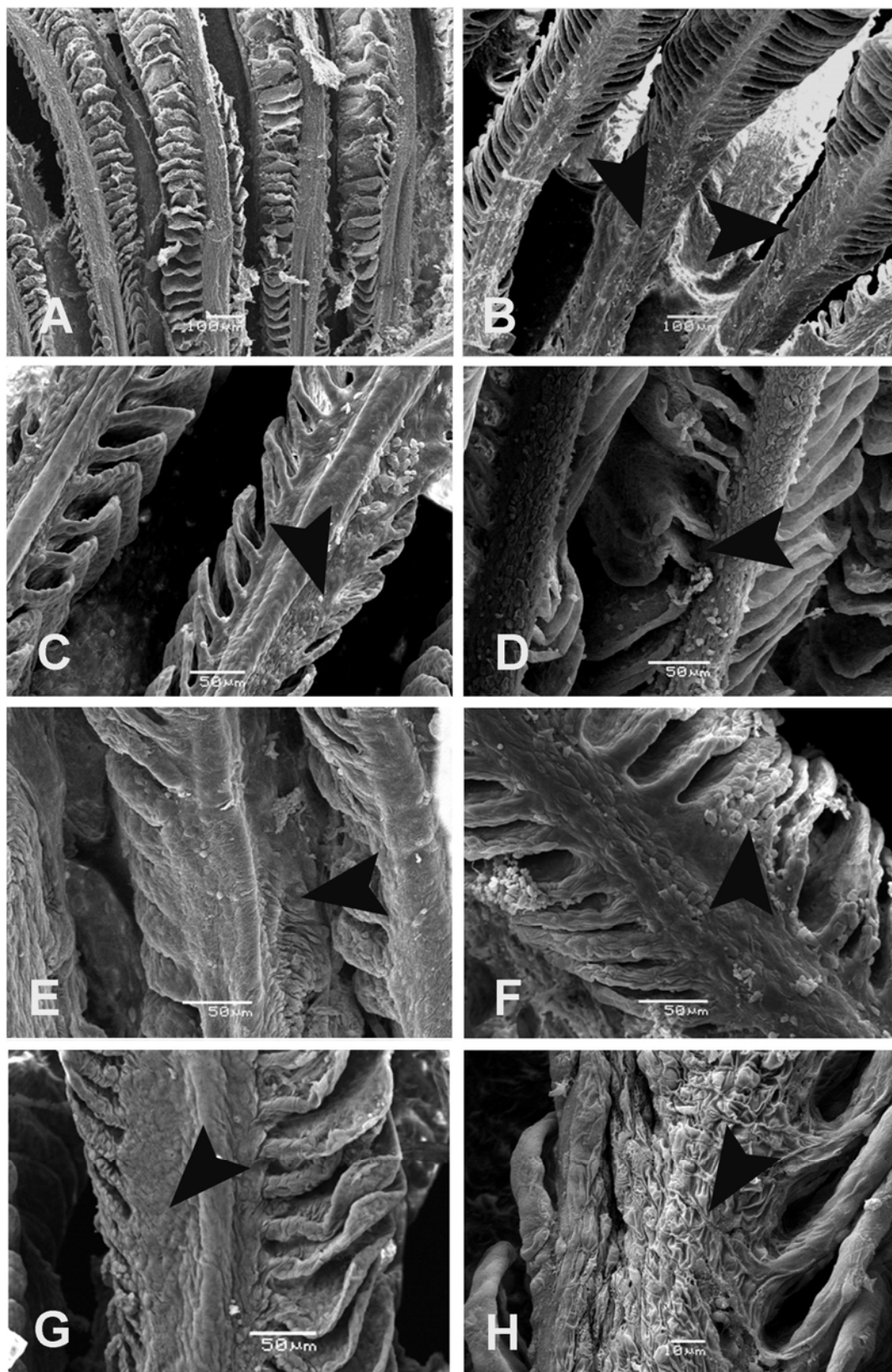


Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura em brânquias de *Astyanax bifasciatus* coletados no reservatório de Salto Caxias - Inverno. A - Alterações no padrão normal das lamelas secundárias. B, C, E e G. Intensa fusão interlamelar das lamelas secundárias. D - Alteração no padrão normal das lamelas secundárias. F - Hiperplasia do epitélio das lamelas secundárias. H - Intensa alteração do padrão do epitélio das lamelas secundárias.

5.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Os resultados para a atividade da enzima catalase (CAT) medida no fígado não mostraram diferenças significativas entre os indivíduos provenientes dos diferentes reservatórios. Em termos sazonais, apenas para exemplares coletados no reservatório Segredo houve diferença significativa, onde os animais coletados no verão mostraram uma maior atividade para essa enzima (Figura 17.I).

Quando analisada a atividade da Glutathione S-Transferase (GST) no fígado de animais coletados no período de verão, foi observada diferença somente entre os reservatórios Segredo e Salto Caxias, sendo que os peixes provenientes de Segredo apresentaram maior atividade da enzima. No inverno, os níveis de atividade da enzima foram maiores em Segredo e Salto Caxias quando comparados com indivíduos coletados nos reservatórios Salto Santiago e Salto Osório. Sazonalmente, somente Salto Santiago apresentou diferença significativa, sendo que os exemplares coletados no verão mostraram maior atividade da enzima (Figura 17.II).

Os resultados obtidos através da lipoperoxidação (LPO) não apresentaram diferenças significativas entre os reservatórios na coleta de verão. No entanto, no inverno, os animais coletados nos reservatórios Foz do Areia e Salto Osório apresentaram níveis maiores que aqueles provenientes do reservatório Salto Santiago, enquanto os indivíduos de Foz do Areia, Segredo e Salto Osório apresentaram níveis significativamente maiores que os animais coletados em Salto Caxias. Foi observada diferença sazonal em Foz do Areia e Salto Osório, sendo que no inverno foram constatados maiores valores de peroxidação lipídica nos peixes coletados nestes reservatórios (Figura 17.III).

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi medida no músculo e no cérebro dos indivíduos coletados em nos cinco reservatórios estudados. Quando avaliada a atividade dessa enzima no músculo, foram observados menores valores nos reservatórios Segredo e Salto Caxias em comparação com indivíduos provenientes dos outros reservatórios na coleta de verão, enquanto no inverno os menores valores foram encontrados em exemplares coletados nos reservatórios Foz do Areia, Segredo e Salto Caixas. Analisando as diferenças sazonais, foi observado que apenas os indivíduos coletados em

Foz do Areia diferiram, mostrando uma menor atividade no período de inverno (Figura 17.IV).

No cérebro, a AChE apresentou maior atividade nos indivíduos coletados no reservatório Salto Osório, na coleta de verão, enquanto na coleta de inverno Segredo e Salto Santiago mostraram menor atividade em relação aos indivíduos coletados em Salto Caxias. Sazonalmente, diferenças significativas foram observadas em Salto Osório e Salto Caxias, sendo no inverno a menor atividade de AChE no reservatório Salto Osório e no verão a menor atividade em Salto Caxias (Figura 17.V).

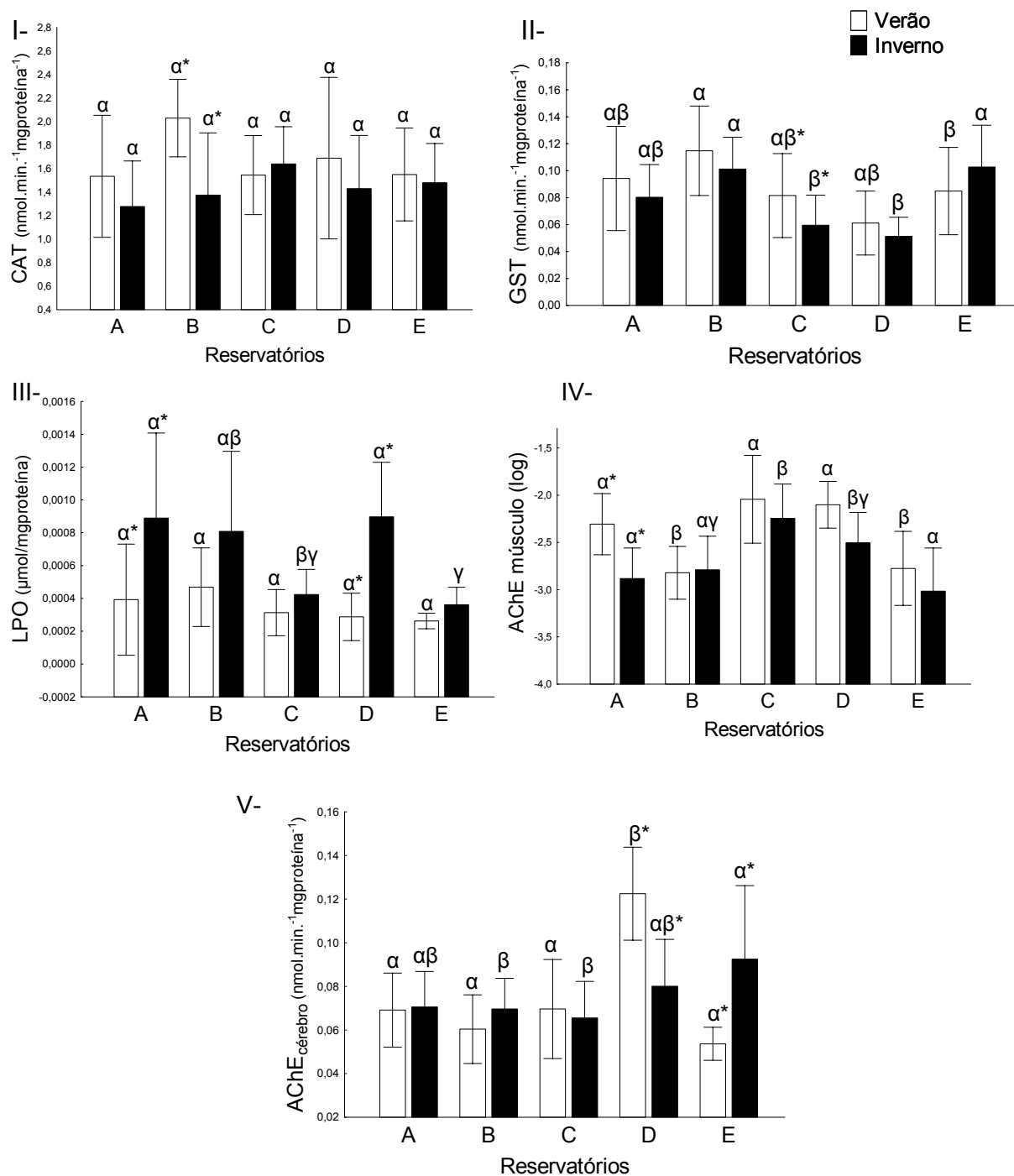


Figura 17: Biomarcadores bioquímicos em *Astyanax bifasciatus* coletados nos reservatórios de Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). I- Lipoperoxidação, II- Atividade da Glutathione S-Transferase, III- Atividade da Catalase, IV- Atividade da AChE no músculo, e V- Atividade da AChE no cérebro. Acima das barras, caracteres gregos indicam diferenças significativas entre os pontos (verão e inverno são independentes), e asteriscos indicam diferenças sazonais nos pontos. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

5.6 BIOMARCADORES GENÉTICOS

Os resultados obtidos no Ensaio Cometa demonstraram que os exemplares provenientes do reservatório Salto Caxias, na coleta de verão, apresentaram mais danos no material genético quando comparados aos animais coletados nos outros reservatórios. Já no inverno, foram observados mais danos nos indivíduos coletados em Salto Santiago. Na comparação sazonal, apenas indivíduos coletados no reservatório Salto Caxias apresentaram variações entre os períodos de coleta, demonstrando mais danos genéticos no verão que no inverno (Figura 18.I).

Para o Teste do Micronúcleo Písceo, tanto na frequência de Micronúcleos como na frequência de Eritrócitos Policromáticos, não foram observadas diferenças significativas entre os indivíduos coletados nos reservatórios, da mesma forma que não foram encontradas diferenças entre os animais coletados nos períodos de verão e inverno para nenhum dos reservatórios estudados.

Em relação às alterações morfológicas nucleares, foi observada maior frequência nos peixes coletados em Segredo, na coleta de verão. Analisando as diferenças sazonais, os peixes de Salto Osório apresentaram mais alterações no inverno (Figura 18.II). Em relação às categorias de AMN, não foram observadas diferenças nas alterações do tipo *blebbed*, *notched*, *lobed* e *vacuolated* entre os reservatórios e estações.

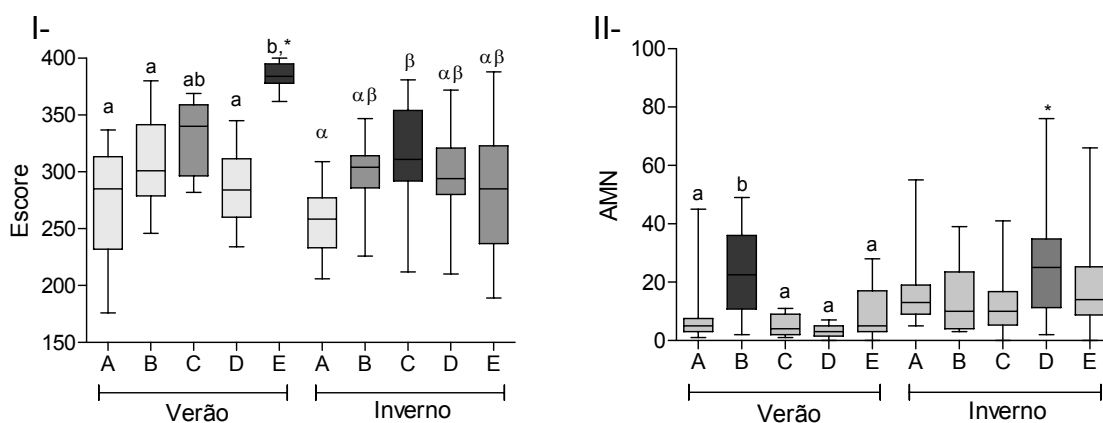


Figura 18: Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo Písceo em *Astyanax bifasciatus* coletados nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). I- Escore de dano no DNA observado pelo Ensaio Cometa, II- Frequência de Alterações Morfológicas Nucleares no Teste de Micronúcleo Písceo. Caracteres latinos (a,b) indicam diferenças significativas entre os pontos no verão, caracteres gregos (α,β,γ) indicam diferenças significativas entre os pontos no inverno, * indica diferenças sazonais nos pontos.

5.7 ANÁLISES QUÍMICAS

5.7.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em bile

A concentração de PAHs na bile foi determinada somente nos animais coletados no verão e nos reservatórios Foz do Areia, Segredo, Salto Santiago e Salto Caxias. A quantidade reduzida de indivíduos amostrada em Salto Osório impossibilitou essa análise para indivíduos deste local.

A média da concentração de PAHs total na bile foi semelhante entre os reservatórios estudados, não havendo diferenças significativas entre eles (Figura 19.I). Em relação à concentração dos PAHs na bile de acordo com o número de anéis aromáticos, todos os reservatórios apresentaram maiores quantidades de hidrocarbonetos de dois anéis em relação aos outros tipos identificados (Figura 19.II).

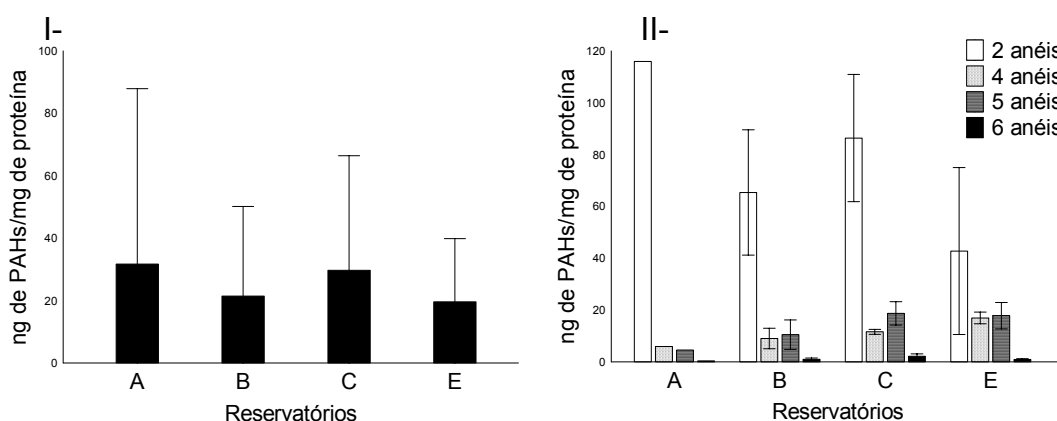


Figura 19: I- Concentração média PAHs totais, e II- Concentração média de PAHs de 2 a 6 anéis por mg de proteína de bile de *Astyanax bifasciatus* coletados nos reservatórios Foz do Areia (A), Segredo (B), Salto Santiago (C), Salto Osório (D) e Salto Caxias (E). Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

5.7.2 Quantificação de metais

5.7.2.1- Água e sedimento

Todos os reservatórios apresentaram metais na água em concentrações mais elevadas do que as permitidas pela legislação (CONAMA, 2005). Em relação ao sedimento, todos os metais analisados encontraram-se presentes no sedimento de todos os reservatórios estudados, em pelo menos uma das

estações (Tabela 6). Tanto no verão como no inverno, dos metais tóxicos na água, apenas o manganês mostrou um gradiente de poluição se considerar a região metropolitana de Curitiba (RMC) como sendo a mais importante fonte poluidora da bacia do rio Iguaçu (Tabela 6 I).

TABELA 6: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE METAIS NA ÁGUA (I) E NO SEDIMENTO (II) NOS RESERVATÓRIOS FOZ DO AREIA (A), SEGREDO (B), SALTO SANTIAGO (C), SALTO OSÓRIO (D) E SALTO CAXIAS (E). VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. ND: NÃO DETECTADO.

I-

Metais em Água ($\mu\text{g/L}$)									
	Ag	Cu	Co	Ni	Cd	Zn	Cr	Mn	Pb
Verão	A	ND	ND	ND	$1,60 \pm 1,15$	$72,56 \pm 20,85$	$75,70 \pm 18,66$	$111,46 \pm 5,20$	ND
	B	ND	ND	ND	$2,23 \pm 0,96$	$11,66 \pm 5,20$	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND	$0,43 \pm 0,25$	$23,25 \pm 3,74$	$69,63 \pm 15,16$	$55,30 \pm 4,57$	ND
	D	ND	ND	ND	$0,27 \pm 0,05$	$42,75 \pm 8,98$	$72,53 \pm 26,16$	$16,83 \pm 1,55$	ND
	E	ND	ND	ND	$5,2 \pm 0,56$	$3,06 \pm 0,61$	ND	$5,36 \pm 1,87$	ND
Inverno	A	ND	ND	ND	$0,56 \pm 0,40$	$43,30 \pm 23,72$	$46,06 \pm 14,93$	$72,23 \pm 5,39$	ND
	B	ND	ND	ND	$4,8 \pm 3,82$	$2,96 \pm 0,37$	ND	$14,00 \pm 2,00$	ND
	C	ND	ND	ND	$1,00 \pm 0,72$	$37,90 \pm 12,58$	$62,53 \pm 18,71$	$21,66 \pm 3,30$	ND
	D	ND	ND	ND	$1,50 \pm 0,4$	$35,00 \pm 12,60$	ND	$7,56 \pm 1,20$	ND
	E	ND	ND	ND	$6,5 \pm 2,55$	$4,03 \pm 0,80$	ND	$16,9 \pm 2,94$	ND

Em negrito, valores acima do permitido pela legislação brasileira.

II-

Metais em Sedimento (mg/kg)									
	Ag	Cu	Co	Ni	Cd	Zn	Cr	Mn	Pb
Verão	A	$44,63 \pm 2,03$	$150,95 \pm 2,63$	$51,01 \pm 2,83$	$17,10 \pm 0,83$	$0,16 \pm 0,04$	$1,69 \pm 0,02$	$59,61 \pm 2,81$	$768,23 \pm 37,88$
	B	$50,19 \pm 0,22$	$164,42 \pm 25,44$	$173,03 \pm 11,12$	$29,53 \pm 5,45$	$0,25 \pm 0,03$	$2,92 \pm 0,01$	$191,50 \pm 4,17$	$2336,77 \pm 237,61$
	C	$47,99 \pm 0,85$	$226,74 \pm 8,17$	$132,39 \pm 3,32$	$20,25 \pm 1,66$	$0,21 \pm 0,01$	$2,58 \pm 0,04$	$46,68 \pm 4,81$	$1321,40 \pm 15,56$
	D	$39,68 \pm 1,93$	$1570,45 \pm 66,23$	$120,74 \pm 8,79$	$17,80 \pm 1,22$	$0,55 \pm 0,06$	$67,13 \pm 3,89$	$143,93 \pm 5,62$	$544,00 \pm 38,40$
	E	$51,32 \pm 0,51$	$485,41 \pm 47,22$	$279,93 \pm 48,94$	$54,71 \pm 15,70$	$0,31 \pm 0,03$	$4,95 \pm 0,32$	$401,30 \pm 37,55$	$4945,96 \pm 208,83$
Inverno	A	$18,39 \pm 0,84$	$162,70 \pm 4,36$	$107,68 \pm 10,82$	$18,20 \pm 0,25$	ND	$1,71 \pm 0,05$	$68,77 \pm 2,44$	$1503,45 \pm 66,98$
	B	$16,00 \pm 1,31$	$168,56 \pm 9,69$	$192,74 \pm 10,65$	$23,66 \pm 1,19$	ND	$2,83 \pm 0,20$	$166,03 \pm 15,35$	$2239,37 \pm 175,49$
	C	$19,95 \pm 1,83$	$76,90 \pm 3,20$	$179,66 \pm 2,73$	$11,92 \pm 0,28$	$0,27 \pm 0,11$	$2,62 \pm 0,12$	$102,82 \pm 9,59$	$2297,15 \pm 216,93$
	D	$30,55 \pm 3,48$	$1479,46 \pm 86,74$	$129,06 \pm 9,21$	$18,93 \pm 1,35$	$0,62 \pm 0,03$	$54,29 \pm 0,78$	$141,83 \pm 10,50$	$520,95 \pm 4,67$
	E	$11,61 \pm 2,61$	$265,013 \pm 13,81$	$176,47 \pm 6,37$	$34,97 \pm 0,37$	ND	$2,67 \pm 0,20$	$288,73 \pm 8,82$	$1789,76 \pm 66,35$

5.7.3 Metais no músculo

Os níveis de metais bioacumulados no músculo dos animais coletados nos reservatórios estudados se mostraram elevados, sendo que todos os reservatórios apresentaram pelo menos um metal com quantidade acima do permitido pela Legislação Brasileira (ANVISA, 1965), em ambas as estações (Tabela 7).

TABELA 7: METAIS BIOACUMULADOS NO TECIDO MUSCULAR DE *Astyanax bifasciatus* COLETADOS NOS RESERVATÓRIOS DE FOZ DO AREIA (A), SEGredo (B), SALTO SANTIAGO (C), SALTO OSÓRIO (D) E SALTO CAXIAS (E). VALORES EXPRESSOS EM MÉDIA \pm DESVIO PADRÃO. ND: NÃO DETECTADO. EM NEGRITO, VALORES ACIMA DO PERMITIDO PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA. *VALORES MÁXIMOS TOLERÁVEIS NÃO PREVISTOS EM LEGISLAÇÃO.

		Músculo (mg/kg)							
		Cr	Cu	Mn*	Cd	Zn	Ni	Pb	Co*
Verão	A	4,10 \pm 3,05	1,23 \pm 0,81	5,52	0,27 \pm 0,11	52,93 \pm 0,03	ND	15,99 \pm 0,90	ND
	B	ND	1,58 \pm 0,24	4,82	ND	84,77	ND	8,75 \pm 1,89	ND
	C	3,76 \pm 4,12	1,76 \pm 0,40	0,96	0,79 \pm 0,24	59,68 \pm 13,38	ND	13,16 \pm 0,41	ND
	D	2,94	2,30	ND	ND	60,25	ND	56,06	ND
	E	7,96 \pm 0,34	2,06 \pm 0,15	ND	4,18 \pm 1,93	28,01 \pm 3,43	ND	1,27 \pm 1,48	ND
Inverno	A	ND	0,94 \pm 0,77	0,48 \pm 0,60	1,39 \pm 0,24	58,92 \pm 7,45	ND	8,75 \pm 3,12	ND
	B	13,17 \pm 11,96	0,21 \pm 0,29	ND	2,79 \pm 0,83	72,87 \pm 22,85	ND	ND	1,53
	C	1,65 \pm 1,97	1,07 \pm 1,28	2,90 \pm 0,9	ND	46,11 \pm 4,02	ND	12,79 \pm 1,25	ND
	D	3,55 \pm 0,35	1,18 \pm 0,11	21,59 \pm 15,89	ND	37,31 \pm 0,60	ND	11,30 \pm 2,05	ND
	E	3,76 \pm 0,44	0,45 \pm 0,26	ND	ND	51,12 \pm 15,29	ND	9,15 \pm 0,47	ND

6 DISCUSSÃO

Este estudo apresentou a avaliação da qualidade da água de uma importante bacia hidrográfica do sul do país, representada pelo rio Iguaçu, utilizando diversos biomarcadores em uma espécie de peixe endêmica (*Astyanax bifasciatus*) da bacia. De maneira geral, e diferentemente do apresentado pelo Relatório de Qualidade das Águas dos Reservatórios do Paraná, não foi verificado um gradiente de depuração da água no Rio Iguaçu a partir da região metropolitana de Curitiba (RMC).

Apesar de o rio Iguaçu receber grande quantidade de substâncias consideradas poluidoras da região metropolitana de Curitiba, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os resíduos industriais oriundos da fabricação de produtos como papel, fertilizantes, automóveis e alimentos, bem como resíduos provenientes da agricultura, atividade predominante na região, podem estar contribuindo para a baixa qualidade da água do rio Iguaçu. Ainda ao longo de seu leito, em direção à foz, encontram-se também, em pequena escala, olarias, madeireiras, curtumes e areais. Além disso, o rio Iguaçu é um potencial receptor de compostos resultantes de vazões acidentais, pelo transporte de cargas perigosas em rodovias que cortam a região ou por derramamento de óleo, como ocorrido em 2000 na região de Araucária-RMC.

Os exemplares da espécie *A. bifasciatus* provenientes dos cinco reservatórios estudados apresentaram alterações medidas através dos biomarcadores que podem ser relacionadas com a baixa qualidade da água, demonstrando que o rio Iguaçu é impactado por xenobióticos ao longo de sua extensão, com variações em diferentes épocas do ano. Os resultados deste estudo mostram a importância da ecotoxicologia na avaliação ambiental, e que a integração de diferentes tipos de biomarcadores permite uma visão mais precisa da real situação em que determinado ambiente aquático se encontra.

Na avaliação da qualidade ambiental, é importante obter informações integradas entre os fatores bióticos e abióticos que regem o funcionamento do ecossistema. Através das análises físico-químicas, foi possível observar a sazonalidade entre os períodos, além de caracterizar os reservatórios de acordo com seus parâmetros abióticos.

A temperatura é um fator que influencia praticamente todos os processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem na água. Variações na temperatura da água refletem diretamente na absorção e metabolismo de xenobióticos, uma vez que alteram a fisiologia e aumentam o metabolismo dos animais. Estas alterações, via de regra, podem ser identificadas por biomarcadores, como os utilizados neste estudo. Em temperaturas baixas, por exemplo, alguns mecanismos celulares relacionados ao metabolismo de xenobióticos podem apresentar atividade reduzida, afetando diretamente o processo de detoxificação (BUSCHINI *et al.*, 2003). No presente estudo, apesar de não ter sido uma regra, a maioria dos biomarcadores bioquímicos apresentaram menor atividade no período de inverno, e a peroxidação lipídica teve tendência a ser maior em todos os reservatórios no período mais frio.

A grande maioria das águas continentais apresenta pH entre 6 e 8, sendo possível encontrar ambientes mais ácidos ou mais alcalinos. No entanto, valores muito altos ou muito baixos de pH podem indicar lançamentos de despejos industriais, quando estes não são devidamente neutralizados (JORDÃO, 2006). Com exceção do reservatório Segredo, os valores de pH dos reservatórios estudados foram considerados satisfatórios segundo a Resolução CONAMA 357/2005, estando dentro do intervalo de 6 a 9 (enquadrados como classe 3). Segredo, por sua vez, apresentou valores de pH abaixo da faixa esperada, podendo indicar altos níveis de poluição neste ambiente.

Níveis ideais de oxigênio dissolvido na água são essenciais para a maioria dos seres que vivem no ambiente aquático, inclusive para os microorganismos envolvidos nos processos de depuração destes ambientes. A determinação do oxigênio dissolvido é muito importante para avaliar as condições da água e detectar impactos ambientais que levam a quadros de eutrofização, por exemplo. Além disso, esses valores podem determinar condições oxidantes, favorecendo formas químicas mais biodisponíveis de moléculas com potencial tóxico.

A variação da concentração de OD ocorre sazonalmente, ou mesmo em períodos de 24 h, em razão da temperatura e da atividade biológica. Em águas mais quentes, ocorre a diminuição da solubilidade dos gases, havendo assim decréscimo na quantidade de oxigênio dissolvido. No presente estudo, a

concentração de OD foi menor no verão em todos os reservatórios, evidenciando o papel da temperatura neste tipo de parâmetro.

No geral, reservatórios pouco poluídos, com características mais oligotróficas, tendem a apresentar maiores concentrações de OD, e o contrário ocorre em locais mais poluídos e eutróficos. No entanto, isso nem sempre ocorre em águas de regiões tropicais e subtropicais, devido ao alto metabolismo causado pelas temperaturas elevadas nesses locais. O reservatório Salto Santiago, apesar de ter apresentado o menor valor de OD, no verão, está dentro do previsto na Resolução CONAMA 357/2005, ou seja, acima de 4 mg/L.

O fator de condição (K) descreve o estado de saúde geral do animal, indicando distúrbios no metabolismo decorrentes do acúmulo diferencial de gordura pelo período reprodutivo ou por algum estresse ambiental (BARBIERI; VERANI, 1994). Em estudos de biomonitoramento, a variação do K é atribuída à qualidade do ambiente, não só pela disponibilidade de alimento (uma vez que este índice trata a relação massa - comprimento), mas também pela interferência de possíveis contaminantes no metabolismo.

Os animais coletados em Salto Santiago apresentaram os menores valores de K, tanto no inverno como no verão. Próximo a este reservatório existem muitas plantações de soja, milho e trigo e, apesar deste parâmetro não ser muito sensível, sendo influenciado por outros fatores como nutrição e doenças, é um indicador de exposição a xenobióticos e fornece informações sobre as reservas de energia do organismo. Vários trabalhos tem relacionado a redução do K a locais contaminados, devido à modificação do ambiente e ao estresse dos animais (WOLF, WOLFE, 2005).

Variáveis como a idade, condição fisiológica e o próprio ambiente podem contribuir para a ocorrência de variações no tamanho do fígado em peixes (TAVARES *et al.*, 2008). Este órgão estoca grande quantidade de gordura e glicogênio (GERMAM; KOZLOVSKAYA, 2001), que são componentes energéticos importantes na manutenção da homeostasia, principalmente durante condições adversas. Os valores de IHS nos reservatórios estudados foram estatisticamente iguais, sendo a única diferença encontrada na comparação sazonal do reservatório Foz do Areia. Neste, o valor do IHS dos peixes coletados no inverno foi maior quando comparado aos do verão,

podendo indicar uma reserva de energia para enfrentar possíveis condições adversas na estação fria.

A atividade da catalase observada nos animais utilizados neste estudo foi similar entre os locais amostrados, notando-se apenas um acréscimo da atividade enzimática no período de verão nos indivíduos provenientes de Segredo. Alguns estudos demonstram que essa enzima pode ser influenciada também pela variação da temperatura, salinidade e luz (POWER; SHEEHAN, 1996), podendo assim interferir na interpretação dos dados, especialmente em estudos de campo. Apesar disso, a catalase é um importante biomarcador de exposição, visto que faz parte do mecanismo antioxidante celular, sendo este ativado quando na presença de xenobióticos que induzem a produção de espécies reativas. Dessa forma, um aumento na atividade da catalase, associado a outros fatores bioquímicos, é um forte indício de estresse oxidativo nas células em estudo.

Os resultados de CAT encontrados nos indivíduos de Segredo podem corroborar os baixos níveis de pH encontrados neste reservatório, indicando maior presença de poluentes na água. Os indivíduos desse reservatório podem, portanto, estar com o sistema antioxidante ativado pela presença de poluentes biodisponíveis.

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima do sistema celular de biotransformação, e os indivíduos de Salto Osório apresentaram os menores níveis de atividade, em ambos os períodos. As análises químicas mostraram grande quantidade de metais no sedimento desse reservatório, e foi observada grande quantidade de Cr na água no período de verão.

No entorno de Salto Osório há intensa atividade agrícola, o que sugere o impacto por pesticidas em geral. No entanto, normalmente, a presença de poluentes orgânicos tende a aumentar a atividade do sistema de bioativação e biotransformação em peixes, e neste caso outro fator não mensurado parece estar interferindo na atividade da enzima GST.

A alta atividade da GST é reflexo do aumento no metabolismo das células do fígado frente à exposição a poluentes orgânicos, e pode ser relacionada também com a geração de espécies reativas pró-oxidantes. Nos indivíduos provenientes do reservatório Salto Osório, foram encontrados os maiores níveis de lipoperoxidação (LPO), principalmente no período de inverno, embora os

reservatórios Foz do Areia e Segredo também tenham apresentado altos níveis de LPO.

Um dos principais fatores que influenciam a lipoperoxidação é a bioacumulação de metais, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e consequentemente levando à LPO. Isto, associado aos dados descritos acima, indica que o reservatório Salto Osório, em especial, pode estar sob o impacto de poluentes e merece um estudo mais detalhado.

Sazonalmente, foi verificado que dois dos reservatórios que apresentam altos níveis de LPO (Foz do Areia e Salto Osório) foram significativamente diferentes, mostrando maiores valores sempre no período de inverno. Este resultado pode ser explicado em parte pelas baixas temperaturas e, portanto, uma menor atividade associada a mecanismos de imobilização e/ou eliminação de contaminantes como metais, aumentando suas concentrações no tecido hepático e favorecendo o estado pró-oxidante.

Em termos gerais, é nítido que dois dos reservatórios com os maiores níveis de LPO (Foz do Areia e Segredo) encontram-se mais próximos geograficamente da RMC, enquanto o reservatório mais distante apresentou baixos níveis de LPO, corroborando os relatórios de impacto publicados para estes ambientes. Como os indivíduos provenientes de Salto Santiago não mostraram níveis semelhantes aos encontrados nos dois primeiros reservatórios (Foz do Areia e Segredo), mas compatíveis com os encontrados nos indivíduos coletados em Salto Caxias, os altos níveis de LPO observados nos indivíduos de Salto Osório sugerem que este reservatório possui uma fonte extra de poluentes, reforçando a discussão acima sobre a necessidade de mais estudos neste reservatório. É importante ressaltar que altos valores de LPO refletem um estado pró-oxidante celular, da mesma forma que mostra a importância deste tipo de biomarcador bioquímico nos estudos de biomonitoramento ambiental.

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) cerebral e muscular foi menor em Segredo e Salto Caxias. Metais como Zn, Pb, Cr e Cd encontrados no músculo dos animais provenientes destes reservatórios corroboram os baixos níveis da AChE encontrados neste tecido, uma vez que metais podem inibir a atividade desta enzima (RABITTO *et al.*, 2005). A inibição da AChE é também o mecanismo de ação de outros poluentes, principalmente classes de

organofosforados e carbamatos (STURM *et al.*, 2000). Dessa forma, é possível que, além de metais, esteja ocorrendo ainda a exposição a esses compostos, devido à presença de atividades agrícolas, principalmente em Salto Caxias. Uma vez que organofosforados e carbamatos possuem uma baixa meia vida no ambiente, a análise da inibição da AChE é uma ferramenta útil para avaliar seu efeito na biota aquática, mesmo quando os compostos químicos não são mais detectáveis nestes ambientes (MONTSERRAT *et al.*, 2007).

Em termos gerais, é possível observar que, no inverno, os indivíduos provenientes de Salto Santiago e Salto Osório apresentaram níveis significativamente maiores de AChE no músculo do que os indivíduos coletados nos reservatórios Foz do Areia, Segredo e Salto Caxias. Neste caso, considerando apenas o período de inverno, esses dados demonstram que os dois primeiros reservatórios, que apresentam níveis significativos de determinados metais, encontram-se afetados pelos despejos da RMC, corroborando os relatórios publicados; e que para os animais coletados em Salto Caxias, alguma fonte pontual de poluentes está atuando e diminuindo a atividade da AChE nesse tecido.

Avaliando a atividade desta enzima para o cérebro, configura-se o mesmo quadro descrito para o músculo, onde os baixos níveis de atividade encontram-se nos três primeiros reservatórios, aumentando nos indivíduos dos dois últimos reservatórios. Neste caso, uma menor atividade foi observada no inverno e no verão respectivamente nos reservatórios Salto Osório e Salto Caxias, demonstrando interferência sazonal na atividade da enzima. A explicação para esta diferença sazonal é difícil, mas possivelmente esteja associada ao despejo pontual de poluentes nesses ambientes.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre os parâmetros histopatológicos no fígado através do Índice de Lesão descrito por Bernet *et al.* (1999), vários tipos de lesões e alterações importantes foram destacadas em animais provenientes de todos os reservatórios estudados, como necroses, neoplasias, diferentes níveis de inflamação e ocorrência de parasitas.

Em termos gerais, as lesões foram mais frequentes no período de verão, onde as altas temperaturas favorecem um maior metabolismo e, portanto maior

bioativação de compostos orgânicos, levando potencialmente a maior produção de metabólitos tóxicos.

Na maioria dos ambientes estudados, a presença de áreas de necrose mostrou uma frequência de mais de 80% nos indivíduos coletados. Este tipo de alteração irreversível pode ser causada pela exposição a xenobióticos devido a distúrbios na estrutura das membranas celulares, alteração em proteínas com inibição enzimática, perturbações da síntese protéica e danos em DNA (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2002 e 2005; BRITO *et al.*, 2012; RABITTO *et al.*, 2005, BUSSOLARO *et al.*, 2012 e OSÓRIO *et al.*, 2014). Assim, a necrose hepática tem sido foco de atenção em programas de biomonitoramento, visto que a perda da integridade e falência desse órgão compromete a saúde dos indivíduos, interferindo com o equilíbrio da população (RABITTO *et al.*, 2005; VELMERUGAN *et al.*, 2007). A grande ocorrência de necrose nos peixes analisados neste estudo pode ser um alerta para a integridade dessas populações.

Os processos inflamatórios encontrados nos tecidos são justificados em parte pela elevada incidências de áreas de necroses. A ocorrência de necroses está diretamente ligada ao comprometimento das membranas celulares e, assim, a lesão destas estruturas pode implicar no aumento da presença de células de defesa, como o recrutamento de leucócitos (SILVA, 2010). A presença de altos níveis de LPO pode ser facilmente correlacionada com a presença de áreas de necrose e, portanto, processos inflamatórios. No entanto, os dados do presente estudo não possibilitam esta afirmação.

A explicação para isto pode se dar pelo fato de que os parâmetros bioquímicos, como os níveis de LPO, constituem biomarcadores mais agudos, enquanto as lesões teciduais, como as necroses, são processos mais a longo prazo e, portanto, se desenvolvem mais lentamente. Isto, por outro lado, não invalida o uso dos parâmetros bioquímicos, pelo contrário, pois se há ocorrência de necrose e LPO, esta última pode ser a causa direta da primeira.

Da mesma forma, é muito difícil, exceto para alguns casos, estabelecer uma relação direta entre os danos morfológicos e a presença de poluentes em determinado ambiente aquático. Neste caso, pelos resultados apresentados, é nítida a fraca condição de saúde apresentada pelos animais amostrados em todos os reservatórios, sem corroborar, no entanto, os dados apresentados nos

relatórios de avaliação destes ambientes. Essa afirmação é possível pois o fígado constitui um órgão vital para a fisiologia dos peixes, visto que é responsável pelo metabolismo de xenobióticos e de inúmeras vias bioquímicas que regem o funcionamento do organismo.

A presença de parasitos está relacionada à susceptibilidade dos peixes a agentes infecciosos, que pode ser causada pela ação de agentes exógenos no sistema imunitário (KHAN; THULIN, 1991). Além disso, a presença de parasitos pode induzir a perda do equilíbrio oxidativo, visto que, ao ser acionada, a atividade fagocitária provoca aumento do consumo de oxigênio, e consequentemente a produção de ROS (BELLÓ *et al.*, 2000; MONSERRAT *et al.*, 2007). Por outro lado, Marcogliese *et al.* (2005) sugere que peixes parasitados são mais suscetíveis ao estresse oxidativo causado pelo ambiente contaminado. Este processo, seja causado ou agravado pelo parasitismo, é pertinente com a atividade da GST e catalase e com os níveis de LPO observados neste estudo.

A atividade da catalase, apesar de não ter sido significativamente diferente entre os locais de coleta, apresentou tendência de ser maior nos em Segredo e Salto Osório, na coleta de verão. A GST teve maior atividade Segredo no verão, e em Segredo e Salto Caxias no inverno. Estes dados coincidem com os locais de coleta em que foram encontrados peixes com maior frequência de parasitos.

As estruturas branquiais, por sua vez, estão envolvidas nas trocas gasosas, no balanço ácido-base e no transporte e excreção de compostos nitrogenados (PERRY, 1997). Sua multifuncionalidade associada à ampla área de superfície que ocupa e à sua localização em contato direto com o ambiente externo faz das brânquias um órgão chave para o monitoramento da ação dos poluentes presentes na água. As lesões e alterações avaliadas neste órgão nos organismos coletados em todos os reservatórios estudados apresentaram características de exposição tanto aguda e como crônica. Vale ressaltar que muitas destas lesões e alterações não são permanentes, e podem regredir caso cesse a exposição ao xenobiótico.

Fusões lamelares não estiveram presentes em todos os organismos provenientes dos reservatórios estudados, mas no reservatório Foz do Areia, localizado mais próximo à RMC, esteve presente de forma branda e severa em

animais provenientes dos dois períodos de coleta. Este tipo de alteração, apesar de ser regressiva, é altamente prejudicial para as trocas gasosas. Dependendo do quadro de evolução, fusões lamelares podem levar o indivíduo ao óbito por asfixia, uma vez que reduzem ou até mesmo impedem completamente a passagem da água entre as lamelas secundárias (LUPÍ *et al.*, 2007), prejudicando a eficiência respiratória (SANTOS, 2007).

As hiperplasias presentes nas lamelas primárias e secundárias podem refletir diretamente o efeito de xenobióticos presentes na água. Os poluentes afetam diretamente o tecido epitelial, levando a uma desorganização deste tecido, com inchaço e hipertrofia das células. As hiperplasias, dependendo do nível de desenvolvimento, podem comprometer duas das mais importantes funções das brânquias: as trocas gasosas e a osmorregulação.

Nas lamelas primárias, a hiperplasia pode causar descamação do epitélio e, conseqüentemente, desarranjo ou até mesmo perda de células de cloro, prejudicando a osmorregulação. Nas lamelas secundárias, essa alteração causa diminuição dos espaços entre as lamelas, podendo alterar o fluxo de água e comprometendo, assim, as trocas gasosas.

Grandes incidências de alterações epiteliais e baixas condições gerais das brânquias foram observadas em indivíduos de vários reservatórios estudados. No entanto, estas alterações foram mais frequentes nos animais coletados no reservatório de Foz do Areia, corroborando a hipótese de que este reservatório possui o pior nível no que diz respeito à qualidade da água. Esta mesma afirmativa não é possível para os indivíduos provenientes do reservatório Segredo, mas aplica-se aos reservatórios seguintes (Salto Santiago e Salto Osório) diminuindo novamente nos indivíduos coletados em Salto Caxias. Esta falta de padrão reflete o fato de esta avaliação ser apenas representativa, pois não são todos os animais que são avaliados, da mesma forma que não são todos os arcos branquiais dos indivíduos analisados que são observados.

A presença de aneurismas encontrados em poucos grupos de animais constitui um dos exemplos de alteração que pode ser regressiva. Essa alteração reflete principalmente distúrbios circulatórios, onde o deslocamento das células pilares leva ao acúmulo do sangue nas lamelas secundárias, o que

pode comprometer o fluxo de sangue nas brânquias e formar trombos com possíveis consequências sistêmicas para o organismo.

As neoplasias, por sua vez, constituem lesões permanentes e colocam em risco, em médio prazo, o funcionamento das brânquias. Se tiverem características de malignidade, pelo papel do órgão e sua localização, podem facilmente se difundir para outros órgãos e tecidos. Esse tipo de lesão se caracteriza pela exposição a agentes que apresentam propriedades cancerígenas como os PAHs, bifenis policlorados (PCBs) e organoclorados, como pesticidas (OCs), dioxinas e furanos.

Dos compostos citados, apenas os PAHs foram analisados, e sua ocorrência em indivíduos coletados em todos os reservatórios não explicam o fato de neoplasias terem sido observadas apenas em Foz do Areia, Segredo e Salto Santiago. No entanto, a presença dessas lesões nos reservatórios mais próximos da RMC é um forte indício de que estes ambientes ainda estão sob a influência dos seus despejos urbanos e industriais. Isto é notório, visto que outros poluentes conhecidamente carcinogênicos (PCBs, OCs, dioxinas e furanos) são encontrados nesse tipo de fonte poluidora, além de serem persistentes no ambiente aquático.

As alterações de ordem geral na estrutura das lamelas primárias e secundárias foram descritas para indivíduos de praticamente todos os reservatórios estudados. Essas alterações podem interferir no bom funcionamento das brânquias, uma vez que têm potencial para alterar o fluxo natural da água entre as lamelas secundárias, evento necessário para as trocas gasosas.

A ocorrência de parasitos nas brânquias foi observada nos indivíduos provenientes dos reservatórios Segredo, Salto Santiago, Salto Osório e Salto Caxias. Este é um dado interessante, pois se sabe que a presença de parasitos em brânquias de peixes é natural, enquanto a ausência total desses organismos pode ser entendida como um caso onde a baixa qualidade da água interfere negativamente nessa associação natural. Neste caso, a ausência de parasitos nas brânquias dos indivíduos coletados em Foz do Areia reforça a hipótese de que os reservatórios mais próximos da RMC encontram-se mais impactados pela presença de substâncias químicas.

Diversos estudos sugerem que alterações morfológicas nas brânquias podem ocorrer diante de mudanças ambientais como tentativas adaptativas de conservar algumas funções fisiológicas (LAURENT; PERRY, 1991). No entanto, as alterações do epitélio branquial, como descritas neste estudo, constituem uma resposta generalizada à maioria dos xenobióticos que podem a curto ou longo prazo comprometer a função do órgão (NOGUEIRA *et al.*, 2008). Dentre os poluentes que interferem nos padrões morfológicos das brânquias de peixes, se destacam os pesticidas, detergentes, ácidos, despejos urbanos e industriais, amônia e metais tóxicos (MACHADO, 1999; MYERS; FOURNIE, 2002; MOZETTO; ZAGATO, 2006; FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2006).

A genotoxicidade foi avaliada por meio do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo Písceo. No Ensaio Cometa, foram observados mais danos no DNA nos animais provenientes dos reservatórios Salto Santiago no verão e Salto Caxias no inverno, que são potenciais receptores de pesticidas, devido à alta atividade agrícola na região do entorno destes reservatórios. Vale salientar que danos genotóxicos, como os medidos pelo Ensaio Cometa, se não forem devidamente reparados, podem ocasionar mutações que influenciam na adaptação de populações de peixes no ambiente aquático (MOCHIDA; FUJI, 2009), além de serem a causa de vários tipos de câncer.

Alta frequência de Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) foi observada nos animais coletados em Segredo no verão e Salto Osório no inverno. Essas alterações resultam de distúrbios na segregação dos cromossomos durante a divisão celular, e assim podem ser consideradas marcadores de genotoxicidade, pois interferem na integridade do genoma celular (GUILHERME *et al.*, 2008). Para que haja uma correta segregação das cromátides ou cromossomos homólogos, é necessária uma organização exemplar do fuso mitótico. Sendo assim, a ocorrência de AMN pode também ser considerada um parâmetro citotóxico por interferir diretamente com a organização do citoesqueleto celular. A alta frequência de AMN tem sido relatada com a exposição a pesticidas, metais, PAHs e outras classes de poluentes (GRISOLIA, 2002, BIANCHI *et al.*, 2011; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; GHISI *et al.*, 2011).

A presença de PAHs na bile é um forte biomarcador para indicar a exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de fontes pirogênicas ou

petrogênicas. Os PAHs denominados pirogênicos resultam da combustão incompleta da matéria orgânica em altas temperaturas e em curto tempo de duração, como a queima de combustíveis fósseis (BURGESS *et. al.*, 2003), sendo caracterizados pela predominância de compostos de maior peso molecular, de 4 a 6 anéis. Por outro lado, os PAHs de origem petrogênica são formados por meio da maturação lenta da matéria orgânica, com predominância de compostos com 2 e 3 anéis (BURGESS *et. al.*, 2003).

Contaminações em locais industrializados normalmente são associadas a esses compostos, devido a derramamentos e vazamentos de tanques usados para transportar e armazenar produtos derivados do petróleo e à queima dos mesmos. Além disso, a presença de PAHs pode também estar associada com atividades de tratamento de madeira, visto que são os principais componentes do creosoto, composto químico utilizado na conservação da madeira.

Níveis praticamente constantes de PAHs na bile encontrados nos indivíduos provenientes dos reservatórios estudados corroboram algumas lesões histopatológicas do fígado, como a ocorrência de neoplasias nos indivíduos dos reservatórios Foz do Areia e Salto Caxias no verão e em níveis mais altos nos indivíduos coletados no inverno de Salto Santiago, uma vez que este tipo de lesão é comumente encontrado em exposições a este tipo de poluentes.

Apesar de as concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontradas neste estudo serem relativamente baixas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; YANG; BAUMANN, 2006), foram observados PAHs na bile de indivíduos provenientes de todos os reservatórios estudados, sendo que os compostos petrogênicos de dois anéis constituíram a fração mais abundante do total de PAHs. Isto mostra que, possivelmente, o processamento do petróleo, bem como o seu uso e de seus derivados, são uma fonte importante destes compostos. Pode-se destacar o acidente ocorrido há mais de 10 anos na RMC, onde 4 milhões de litros de óleo foram despejados no rio Iguaçu com uma mancha de mais de 50 km. Se este acidente ainda reflete na qualidade da água do rio Iguaçu, é algo ainda a ser estudado. No entanto, quantitativamente, a presença de compostos com dois anéis aparenta estar mais abundante nos indivíduos dos reservatórios Foz do Areia e Segredo, e parece diminuir gradativamente até Salto Santiago e Salto Caxias. Curiosamente, para os

compostos pirogênicos, o gradiente parece se inverter, o que de alguma forma favorece a hipótese discutida acima.

O peso molecular dos PAHs determina o tempo de degradação e deposição na coluna d'água. Hidrocarbonetos leves, como os de dois anéis (por exemplo, naftaleno), permanecem menos tempo no ambiente devido à rápida degradação. No entanto, apesar de serem mais facilmente degradados, a presença desses na bile comprova que há uma exposição continuada a esses compostos. Isto significa dizer que os ambientes estudados estão sob constante impacto deste tipo de contaminante. Em termos de risco de exposição, os compostos mais leves são prejudiciais aos ambientes naturais e mesmo ao homem, sendo classificados como possíveis cancerígenos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Quanto aos compostos mais pesados, são destacados os benzo(a)pirenos e fenantrenos, que são conhecidamente carcinogênicos, e de alto risco para a integridade da biota. Aparentemente todos os reservatórios encontram-se sob a influência destes compostos.

A contaminação por metais se destaca dentre os diversos tipos de problemas ambientais decorrentes de atividades antrópicas, e os ecossistemas aquáticos são especialmente sensíveis à presença destes agentes tóxicos, devido aos processos de especiação, bioacumulação e biomagnificação (MENDIL *et al.*, 2010). Por não serem biodegradados, os metais permanecem em ciclos biogeoquímicos globais e, uma vez presentes nos cursos hídricos, os metais são absorvidos pelos peixes, tanto pelo trato gastrintestinal como pelo epitélio branquial (KOSANOVIC *et al.*, 2007), podendo acumular-se e atingir níveis elevados e tóxicos, comprometendo a integridade celular.

Os resultados deste trabalho mostram que todos os metais analisados encontram-se presentes no sedimento de todos os reservatórios estudados em ambos os períodos considerados. Sendo assim, quer por eventos geológicos naturais ou antropogênicos, os reservatórios do rio Iguaçu encontram-se comprometidos pela presença de metais no sedimento.

A presença de metais na água significa que estes se encontram em suspensão ou associados à matéria orgânica. No presente estudo, Cr foi observado na água dos reservatórios Foz do Areia, Salto Santiago e Salto Osório em níveis superiores aos estabelecidos como concentração segura para

o consumo pela Legislação Brasileira, em pelo menos uma das estações. O Cd, apesar de ter sido observado em pequenas concentrações, esteve presente em todos os reservatórios estudados. Este é um metal altamente tóxico, considerado não essencial, e pode ser prejudicial para os seres vivos em qualquer concentração. Os metais, quando presentes na água, indicam que estes ambientes apresentam condições físico-químicas favoráveis à dissociação desses elementos presentes no sedimento, aumentando assim a biodisponibilidade.

O músculo, tecido que é veículo natural de exposição humana, apresentou Zn e Cu bioacumulados em todos os reservatórios e períodos analisados. O Pb foi encontrado em indivíduos de todos os reservatórios, exceto em Segredo no inverno, enquanto o Cr foi também encontrado em indivíduos de todos os reservatórios exceto em Segredo no verão e em Foz do Areia no inverno. Todos esses metais são conhecidamente tóxicos para a fisiologia celular, e a presença no músculo pode explicar os distúrbios associados com a atividade da AChE, como relatado anteriormente, além de apresentar riscos para a exposição humana.

Em termos gerais, foram detectados diversos metais, tanto na água como no sedimento e tecido muscular dos animais provenientes dos reservatórios estudados. O fato de alguns destes metais serem encontrados em níveis acima dos estabelecidos pela Legislação Brasileira demonstra que o rio Iguaçu está sob forte impacto antrópico. Além disso, a presença de vários metais bioacumulados no músculo de *Astyanax bifasciatus* assegura eventos de biomagnificação, que podem colocar em risco a sobrevivência de outras espécies, principalmente as piscívoras.

Apesar de atualmente os reservatórios estudados não serem utilizados para abastecimento público, há a possibilidade de serem usados para este fim futuramente. Além disso, os reservatórios são muitas vezes utilizados para pesca e/ou para a produção de pescado. Portanto, o consumo desta e de outras espécies presentes no rio Iguaçu constituem preocupantes riscos de exposição humana.

Em monitoramento ambiental, o uso de espécies nativas é essencial para determinar as reais condições e ameaças à fauna local. O rio Iguaçu, além de apresentar unidades de conservação ao longo de seu leito, possui

diversas espécies endêmicas, sendo que a manutenção da sua integridade é de extrema importância a sua conservação e manejo. Estudos de biomonitoramento como este, além de apresentarem dados relevantes para monitoramentos futuros, são igualmente importantes para a adequação das políticas ambientais em prol do desenvolvimento da bacia do rio Iguaçu.

7 CONCLUSÕES

- Em termos gerais, os resultados mostram que os reservatórios Foz do Areia, Segredo, Salto Santiago, Salto Osório e Salto Caxias encontram-se impactados pela atividade antrópica em diferentes níveis, afetando significativamente a saúde dos peixes da espécie *Astyanax bifasciatus*;
- A ocorrência de alterações morfológicas no fígado e nas brânquias dos exemplares de *A. bifasciatus* é indício de que a exposição aguda e crônica aos xenobióticos listados coloca em risco a sobrevivência desta espécie;
- Alguns dos parâmetros bioquímicos são importantes para a identificação de exposição aguda, bem como para explicar a ocorrência de outros biomarcadores, principalmente os morfológicos;
- A bioacumulação de metais no tecido estudado e de PAHs na bile auxiliaram a compreensão dos efeitos observados;
- A presença de PAHs na bile indica que os reservatórios encontram-se contaminados por fontes principalmente petrogênicas;
- As análises químicas mostraram que o rio Iguaçu é impactado pela atividade antrópica, sofrendo importante contribuição dos despejos urbano e industrial da região metropolitana de Curitiba, mas esta não é, no entanto, a única fonte de poluição do rio Iguaçu;
- A presença de diversos metais biacumulados no músculo evidencia o consumo de pescados no rio Iguaçu como um importante veículo de exposição da biota e humana;
- Os resultados apresentados neste estudo são de grande importância, pois constituem a base para futuros trabalhos de biomonitoramento na bacia do rio Iguaçu;
- Igualmente, estes resultados são, em curto prazo, a base para as políticas de manejo e conservação deste importante ecossistema para o Paraná, bem como para a região Sul do Brasil;
- Futuras análises químicas serão importantes para uma avaliação mais completa da presença de outras classes de poluentes possíveis de serem encontradas na bacia do rio Iguaçu;

- Finalmente, apesar de o pequeno porte dificultar a utilização de um número maior de biomarcadores, a espécie *A. bifasciatus* utilizada neste estudo se mostrou um bioindicador adequado, principalmente pela facilidade na coleta destes animais em todos os reservatórios estudados.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126, 1984.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation research*, v. 343, n. 2-3, p. 121-35, 1995.

ANDREOLI, C.V. Mananciais de abastecimento: planejamento e gestão. Estudo de caso da bacia do Altíssimo Iguaçu. Curitiba: Sanepar. 494 p., 2003.

ANVISA. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. Decreto nº 55.871, de 26 de Março de 1965.

ASSIS, C.R.D.; LINHARES, A.G.; OLIVEIRA, V.M.; FRANÇA, R.C.P.; CARVALHO, E.V.M.M.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO JR, L.B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Science of the Total Environment*, v. 441, p. 141–150, 2012.

AZEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Carlos, RiMa, 340 p., 2003.

BARBIERI, G., PERET, A. L., VERANI, J. R. Notas sobre a adaptação do trato digestivo ao regime alimentar em espécies de peixes da região de São Carlos (SP). *Revista Brasileira de Biologia*. 54, 63-69, 1994.

BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C.S; BAUMGARTNER, D.; BIFFI, A.G.; DEBOA, T.; FRANA, V.A. Peixes do baixo rio Iguaçu. Maringá, EDUEM, 203 p., 2012.

BELLÓ, A.R.; FORTES, E.; BELLÓ-KLEIN, A.; BELLÓ, A.A.; LLESUY, S. F.; ROBALDO, R.B.; BIANCHINI, A. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 42, p. 233-236, 2000.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, v. 22, p. 25-34, 1999.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 4, p. 826-33, 2011.

BOELSTERLI, U.A. *Mechanistic Toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets*. Taylor and Francis, London, 312 p., 2003.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, I.A.; FREIRE, C.A.; YAMAMOTO, F.Y.; SILVA DE ASSIS, H.C.; SOUZA-BASTOS, L.R.; CESTARI, M.M.; GHISI, N.C.; PRODOCIMO, V.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. *Journal of Environment Monitoring*, v. 14, p. 615-625, 2012.

BRUIJN, J.; HERMENS J. Inhibition of acetylcholinesterase and acute toxicity of organophosphorous compounds to fish: a preliminary structure-activity analysis. *Aquatic Toxicology*, v. 24, p. 257-274, 1993.

BURGESS, R.M.; AHRENS, M.J.; HICKEY, C.W.; DEN BESTEN, P.J.; HULSCHER, D.T.; VAN HATTUM, B.; MEADOR, J.P.; DOUBEN, P.E.T.; An Overview of the Partitioning and Bioavailability of PHAs in Sediments and Soils. PAHs: an ecotoxicological perspective. John Wiley & Sons, p. 99-216, 2003.

BUSCHINI, A.; CARBONI, P.; MARTINO, A.; POLI, P.; ROSSI, C. Effects of temperature on baseline and genotoxificant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 537, n. 1, p. 81 -92, 2003.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; GLINSKI, A.; ROCHE, H.; GUILOSKI, I.C.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Bioaccumulation and related effects of PCBs and organochlorinated pesticides in freshwater fish *Hypostomus commersoni*. *Journal of Environment Monitoring*, v.14, p. 2154-2163, 2012.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 47, n. 11, p. 2123-2136, 1990. NRC Research Press Ottawa, Canada.

CASTRO, L.; FREEMAN, B.A. Reactive Oxygen Species in Human Health and Disease. Nutrition, v. 17, p. 161-165, 2001.

ÇAVAŞ, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. Food and Chemical Toxicology, v. 43, p. 569-574, 2005.

CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radical Biology & Medicine, v. 48, p. 749–762, 2010.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Molecular Biotechnology, v. 26, 2004.

CONAMA. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Resolução nº 357, de 17 de Março de 2005.

ELLMANN, G.L.; COUTNEY, K.O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M.A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, v. 7, p. 88-95, 1961.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. Genetics and Molecular Biology, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FONTAÍNHAS-FERNADES, A. O Uso de Biomarcadores em Toxicologia Aquática. Porto: UTAD, 2006. p 34.

GARAVELLO, J.C.; SAMPAIO, F.A.A. Five new species of genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). Brazilian Journal of Biology, v. 70, n. 3, p. 847-865, 2010.

GERMAM, A.V.; KOZLOVSKAYA, V.I. Hepatosomatic index e the biochemical composition of the liver in *Abramis brama* in the Sheksna Stretch of the Rybinsk reservoir at different levels of toxicant accumulation. Journal of Ichthyology, v. 41, p. 160-163, 2001.

GHISI, N.C.; RAMSDORF, W.A.; FERRARO, M.V.M. et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. Environmental Monitoring and Assessment, v. 180, p. 589-599, 2011.

GRISOLIA, C.K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 518, p. 145-150, 2002.

GUILHERME, S.; VÁLEGA, M.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, M A; PACHECO, M. Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. Ecotoxicology and environmental safety, v. 70, p. 411-421, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. Nova York: Oxford. University Press, v. 1, 851 p., 2007.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Research, v. 18, n. 2, p. 187-190, 1973.

HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 18, p. 277-291, 1991.

HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. Phytochemistry, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

IBGE: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Estudos & Pesquisas, Informação Geográfica, n. 7, Rio de Janeiro, 2010.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Analytical Biochemistry, v. 202, p. 384-389, 1992.

JORDAO, E.P. Água - Uso Racional. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 1, p. 30-31, 2006.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferases. Journal of Biological Chemistry, v. 251, p. 6183–6188, 1976.

KHAN, R.A.; THULIN, J. Influence of pollution on parasites of aquatic animals. Advances in parasitology, v. 30, p. 201-238, 1991.

KOSANOVIC, M.; HASAN, M.Y.; SUBRAMANIAN, D.; AL AHBABI, A.A.; AL KATHIRI, O.A.; ALEASSA, E.M.; ADEM, A. Influence of urbanization of the western coast of the United Arab Emirates on trace metal content in muscle and liver of wild Red-spot emperor (*Lethrinus lentjan*). Food and Chemical Toxicology, v. 45, p. 2261–2266, 2007.

KOUKAL, B.; DOMINIK, J.; VIGNATI, D.; ARPAGAU, P.; SANTIAGO, S.; OUDDANE, B.; BENAABIDATE, L. Assessment of water quality and toxicity of polluted Rivers Fez and Sebou in the region of Fez (Morocco). Environmental Pollution, v. 131, p. 163–172, 2004.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Marine Pollution Bulletin, v. 46, p. 182–186, 2003.

LAURENT, P.; PERRY, S. F. Environmental effects on fish gill morphology. Physiological Zoology, v. 64, n. 1, p. 4-25, 1991.

LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 57, p. 195-211, 1993.

LUPI, C.; NHACARINI, N.I.; MAZON, A.F.; SÁ, O.R. Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. Revista Fafibe on line, Bebedouro, n. 3, 2007.

MAACK, R. Geografia Física do Paraná. 2.ed. Rio de Janeiro: José Olympio, 450 p., 1981.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. UNOPAR Científica, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, Out, 1999.

MARCOGLIESE, D.J.; BRAMBILLA, L.G.; GAGNÉ, F.; GENDRON, A.D. Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch. *Diseases of Aquatic Organisms*, p. 77-84, 2005.

MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 68, p. 426-435, 2007.

MELA, M.; CAMBIER, S.; MESMER-DUDONS, N.; LEGEAY, A.; GROTZNER, S.R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FIX VENTURA, D.; MASSABUAU, J.C. Methylmercury localization in *Danio rerio* retina after trophic and subchronic exposure: a basis for neurotoxicology. *NeuroToxicology*, v. 31, p. 448–453, 2010.

MENDONÇA, F. Riscos, vulnerabilidade e abordagem socioambiental urbana: uma reflexão a partir da RMC e de Curitiba. Editora UFPR, n. 10, p. 139-148, 2004.

MENNI, R.C.; GOMEZ, S.E.; LOPEZ-ARMENGOL, F. Subtle relationships: freshwater fishes and water chemistry in southern South América. *Hydrologia*, v. 328, n.3, p. 173-197, 1996.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, v. 399, p. 135-147, 1998.

MOCHIDA, K.; FUJI, K. Toxicity for aquatic organisms. In: ARAI, T.; HARINO, H.; OHJI, M.; LANGSTON, W. J. *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer, p. 149-160, 2009.

MONSERRAT, J.M.; MARTINEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, B.L. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, v. 146, p. 221-234, 2007.

MOZETO, A.A. Caracterização do estoque de metais pesados, compostos orgânicos voláteis e nutrientes dos sedimentos e dos particulados das represas

do Guarapiranga e Billings, RMSP, Universidade Federal de São Carlos: Brasil, 1997.

MOZETO, A.A.; ZAGATTO, P.A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, p 16- 37, 2006.

MYERS, M.S.; FOURNIE, J.W. Histopathological Biomarkers as Integrators of Anthropogenic and Environmental Stressors. In: Adams, S. M Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, p. 221-287, 2002.

NOGUEIRA, D.J.; CASTRO, S.C.; SÁ, O.R. Avaliação da qualidade da água no reservatório UHE Furnas - MG, utilizando as brânquias de *Pimelodus maculatus* (LACÉPÈDE, 1803) como biomarcador de poluição ambiental. Ciência et Praxis, Passos, v. 1, n. 1, 2008.

NUNES, B.; BARBOSA, A.R.; ANTUNES, S.C.; GONÇALVES, F. Combination effects of anticholinesterasics in acetylcholinesterase of a fish species: effects of a metallic compound, an organophosphate pesticide, and a pharmaceutical drug. Environmental Science and Pollution Research, v. 21, n. 9, p. 6258-6262, 2014.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; BELGER, L.; PELLETIER, E.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Environmental Research, v. 90, p. 217-225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y; SANCHEZ-CHARDI, A; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. Aquatic Toxicology, v. 74, p. 53–69, 2005.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; PADRÓS, J.; VALDEZ DOMINGOS, F.X.; AKAISHI, F.M.; PELLETIER, E. Histopathological evidence of antagonistic effects of tributyltin on benzo[a]pyrene toxicity in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Science of the Total Environment, v. 372, p. 549-553, 2007.

OLSON, D.L.; CHRISTENSEN, G.M. Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). Environmental Research, v. 21, n. 2, p. 327–335, 1980.

OSÓRIO, F.H.T.; SILVA, L.F.O.; PIANCINI, L.D.S.; AZEVEDO A.C.B.; LIEBEL, S.; YAMAMOTO, F.Y.; PHILIPPI, V.P.; OLIVEIRA, M.L.S.; ORTOLANI-MACHADO, C.F.; FILIPAK NETO, F.; CESTARI, M.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, p. 9145–9160, 2014.

PERRY, S.F. The chloride cell: structure and functions in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*, v. 59, p. 325-347, 1997.

POLARD, T.; JEAN, S.; MERLINA, G.; LAPLANCHE, C.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, n. 1, p. 144-149, 2011.

POWER, A., SHEENAN, D. Seasonal variation in the antioxidant defence system of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Compar. Biochem. And Physiol. Part 114C*, v. 2, p. 99-103, 1996.

RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.E.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, n. 2, p. 147-156, 2005.

RABITTO, I.S.; BASTOS, W.R.; ALMEIDA, R.; ANJOS, A.; HOLANDA, I.B.; GALVÃO, R.C.; NETO, F.F.; MENEZES, M.L.; SANTOS, C.A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. *Environment International*, v. 37, n. 1, p. 56-65, 2011.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAVARES-DIAS, M. Eritrograma, relação viscerossomática, hepatossomática e esplenossomática em tainhas *Mugil platanus* (Osteichthyes, Mugilidae) parasitadas. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 19, n.3, p. 807-818, 2002.

SANTOS, S.G.; MONTEIRO, S.M; CARROLA, J; FERNANDES-FONTAINHAS, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 2, 2007.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SEIFFERT, N.F. Política ambiental local. Florianópolis: Insular, 230 p., 2008.

SILVA, J.C. Biomarcadores morfológicos e análise da bile em peixe para avaliação da qualidade da água do Rio Iguaçu. Dissertação de mestrado apresentada na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SOUSA, D.B.P.; ALMEIDA, Z.S.; CARVALHO-NETA, R.N.F. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da costa maranhense, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 2, p. 369-376, 2013.

SPEARLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 452 p., 2005.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), v. 113, p. 203-12, 1999.

STRASKRABA, M.; TUNDISI, J.G. Gerenciamento da qualidade da água de represas. São Carlos: ILEC/IIE. 258 p., 2000.

STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, v. 47, p. 389-398, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L.; LEMOS, J.R.G.; FIM, J.D.I.; AFFONSO, E.G.; ONO, E.A. Índices de condição corporal em juvenis de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) e *Colossomona macropomum* (Cuvier, 1818) na Amazônia. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 34, n. 2, p. 197-204, 2008.

TICE, R. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: PHILLIPS, D.H.; VENNIT, S. (eds.). Environmental Mutagenesis. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, p. 315-339, 1995.

TUNDISI, J.G. Reservatórios como sistemas complexos: Teoria, aplicações e perspectivas para usos múltiplos. In: HENRY, R. (ed.). Ecologia de reservatórios: Estrutura, função e aspectos sociais. Botucatu: FUNDIBIO; FAPESP. p. 19-38, 1999.

TUNDISI, J.G. Água no século XXI: enfrentando a escassez. São Carlos, RiMa, IIE, 2. ed., 248 p., 2005.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; OHTSUKA, Y.; NAKAMURA, T.; KOBAYASHI, J.; SOFUNI, T. A Preliminary Study of the Micronucleus Test by Acridine Orange Fluorescent Staining Compared with Chromosomal Aberration Test Using Fish Erythropoietic and Embryonic Cells. Water Science & Technology, v. 25, n. 11, p. 235–240, 1992.

VAZZOLLER, A.E.A.; MENEZES, N.A. Síntese dos conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). Revista Brasileira de Biologia, v. 52, p. 627-640, 1992.

VELMURUGAN, B.; SELVANAYAGAM, M.; CENGIZ, E.I.; UNLU, E. Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 24, p. 286–291, 2007.

WOLF, J.C.; WOLFE, M.J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. Toxicologic Pathology, v. 33, p. 75-85, 2005.

YANG, X., BAUMANN, P.C. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. Ecological Indicators, v. 6, p. 567-574, 2006.

ZAIDI, B.; IMAM, S. Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the caribbean coastal water. Marine Pollution Bulletin, v. 38, p. 737–742, 1999.